

Aus dem Institut für Experimentelle Tumorforschung
(Direktorin: Prof. Dr. rer. nat. Susanne Sebens)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Untersuchung zum Einfluss immunsuppressiver Therapie
auf die Interaktion von cholangiozellulären Tumorzellen und
tumorassoziierten Fibroblasten**

INAUGURAL DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Tillmann Max Heinze
aus Naumburg (Saale)

Kiel 2020

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Holger Kalthoff, Institut für Experimentelle Tumorforschung

2. Berichterstatter/in: Priv.-Doz. Dr. Christine Halske, Institut für Pathologie

Tag der mündlichen Prüfung: 25.11.2021

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 13.09.2021

gez.: Prof. Dr. Holger Kalthoff

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhalt	Seite
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einführung	1
1.1 Das cholangiozelluläre Karzinom	1
1.2 Das entzündliche Tumorstroma	2
1.3 Bedeutung löslicher Mediatoren und ihre Signalwege im Tumorstroma von CCCs	3
1.4 Lebertransplantation beim CCC	5
1.5 Die Rolle von immunsuppressiver Therapie nach oLTX beim CCC	6
2 Arbeitshypothese und Zielsetzung	9
3 Materialien	10
3.1 Zelllinien	10
3.2 Antikörper	10
3.3 Chemikalien und Reagenzien	11
3.4 Kits	12
3.5 Puffer	12
3.6 Arzneimittel	13
3.7 Verbrauchsmaterialien	13
3.8 Geräte	13
4 Methoden	15
4.1 Zellkultur	15
4.2 Isolierung primärer Fibroblasten	16
4.3 Objektträgerkulturen und Charakterisierung der tumorassoziierten Fibroblasten	16
4.4 Tumorzelllinien	17
4.5 Gewinnung von Fibroblasten-konditioniertem Medium (KM)	17
4.6 Co-Kultur im modifizierter Boydenchamber Assay 48h	17
4.7 Messung der Zytokinexpression	18
4.8 Stimulation der CCCs mit KM – Proteinbiochemische Methodik	19
4.8.1 Stimulation der Zellen mit KM	19
4.8.2 Herstellen von Zelllysaten	19
4.8.3 Proteinextraktion und Bestimmung der Proteinkonzentration	20
4.8.4 SDS Page	20
4.8.5 Western Blot	20
4.8.6 Indirekter Antikörperrnachweis	21
4.9 Kristallviolett Viabilitäts Assay	21

4.10	Behandlung der Ko-Kultur aus CCCs und TAFs mit Everolimus, MPA oder CsA im modifizierter Boydenchamber Assay für 30 h	22
4.11	Behandlung mit Everolimus - Proteinbiochemische Methodik	22
4.11.1	Behandlung der CCCs mit Everolimus vor Stimulation mit hIL-6 oder FCS	22
4.11.2	Behandlung der TFK-1 mit Everolimus vor der Stimulation mit KM	23
4.11.3	Behandlung der TAFs mit Everolimus und Sorafenib vor der Gewinnung von konditioniertem Medium	23
4.12	Statistische Auswertung	23
5	Ergebnisse	24
5.1	Immunzytochemische Charakterisierung der TAFs	24
5.2	Stimulation der CCCs durch TAFs im modifizierten Boydenchamber Ansatz	24
5.3	Zytokinexpressionsmuster der TAFs	25
5.4	Stimulation der CCCs durch KM - Einfluss auf Akt, STAT3 und Erk	26
5.5	Einfluss von Cyclosporin A, MPA und Everolimus auf die Zellviabilität der CCCs und TAFs	28
5.6	Einfluss von Cyclosporin, MPA und Everolimus auf die Ko-Kultur aus CCCs und TAFs	31
5.7	Behandlung der CCCs mit Everolimus vor Stimulation mit FCS und hIL-6	32
5.8	Behandlung der TFK-1 mit Everolimus vor Stimulation mit KM	34
5.9	Behandlung der TFK-1 mit KM von mit Everolimus vorbehandelten TAFs	34
6	Diskussion	36
6.1	Die Bedeutung α -SMA positiver, tumorassoziierter Fibroblasten beim cholangiozellulären Karzinom	37
6.2	Durch parakrine Mediatoren vermittelte Stimulation cholangiozellulärer Tumorzellen	38
6.3	Stimulation intrazellulärer Signalwege beim cholangiozellulären Karzinom	40
6.4	Der Einfluss immunsuppressiver Medikamente auf CCCs und TAFs	43
6.4.1	Cyclosporin A	43
6.4.2	Mycophenolsäure	44
6.4.3	Everolimus	45
7	Zusammenfassung	49
8	Literaturverzeichnis	51
9	Anhang	V
	Danksagung	V

Abkürzungsverzeichnis

Akt	Proteinkinase B
CCC	cholangiozelluläres Karzinom
CsA	Cyclosporin A
CXCL	CXC-Motiv-Ligand
CXCR	CXC-Rezeptor
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
Erk	‘extracellular-signal regulated kinases’
FCS	‘fetal calf serum’
FGF	‘fibroblast growth factor’
FOX	Forkhead-Box-Proteine
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HGF	‘hepatocyte growth factor’
iCCC	intrahepatische cholangiozelluläres Karzinom
IGF	‘insulin-like growth factor’
IL	Interleukin
IMPDH	Inosinmonophosphat-Dehydrogenase
JAK	Januskinase
KM	Konditioniertes Medium
MCP	Monozyten Chemotaxis Protein
MEK	‘mitogen-activated protein-kinase kinase’
MIF	Makropagen Migration inhibierender Faktor
MPA	Mycophenolsäure
mRNA	messenger RNA
mTOR	‘mechanistic target of Rapamycin’
mTORC	‘mechanistic target of Rapamycin Complex’
MW	Mittelwert
oLTX	orthotope Lebertransplantation
pAkt	phosphorylierte Proteinkinase B
PBS	phosphate buffered saline

pCCC	peripheres cholangiozelluläres Karzinom
PDGF	`platelet-derived growth factor´
pErk	phosphorylierte `extracellular-signal regulated kinase´
phCCC	perihiläres cholangiozelluläres Karzinom
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
pSTAT	phosphorylierter `signal transducers and activators of transcription´
Raf	`rapidly accelerated fibrosarcoma protein´
Ras	`rat sarcoma protein´
RIPA	`radioimmunoprecipitation Assay´
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Kulturmedium
SD	Standardabweichung
SDF	`stromal derived factor´
STAT	`signal transducers and activators of transcription´
TAF	Tumor assoziierte Fibroblasten
TBS	Tris-buffered saline
TGF	`transforming growth factor´
TRAIL	`tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand´
αSMA	`α-smooth muscle actin´

1 Einführung

1.1 Das cholangiozelluläre Karzinom

Das cholangiozelluläre Karzinom (CCC) ist einer der häufigsten histologischen Typen primärer Lebertumoren und ist weltweit im Mittel für etwa 15 % aller primären Lebertumore verantwortlich (Parkin et al., 1993). Als Ausgangsgewebe des Tumors wird dabei allgemein das Epithel des biliären Gangsystem angesehen, wobei einzelne Studien auch einen alternativen hepatozellulären Ursprung diskutieren (Fan et al., 2012; Sekiya & Suzuki, 2012). Prinzipiell kann man die cholangiozellulären Karzinome nach ihrer anatomischen Herkunft in intrahepatische (iCCC), perihiläre (phCCC) und periphere Karzinome (pCCC) einteilen. Im engeren Sinne werden nur Tumore des intrahepatischen Gangsystems als cholangiozelluläre Karzinome betrachtet, klinisch lassen sich jedoch häufig intrahepatische Tumore nicht immer eindeutig von extrahepatischen Tumoren im Bereich der Hilusregion oder Hepatikusgabel, sogenannten Klatskin-Tumoren, unterscheiden. Zwar kommt das cholangiozelluläre Karzinom insgesamt deutlich seltener vor als das hepatozelluläre Karzinom (HCC), jedoch konnte in den letzten Jahrzehnten auch in der westlichen Welt eine zunehmende Inzidenz beobachtet werden (Khan et al., 2002; Shin et al., 2010). Die Inzidenzen variieren dabei regional stark. Die höchsten Raten werden aus Südostasien mit bis zu 71,3 pro 100.000 Einwohner, und die niedrigsten aus Australien mit 0,1 pro 100.000 Einwohnern berichtet. In Europa schwanken die berichteten Raten zwischen 0,4 und 1,8 pro 100.000 Einwohner (Khan et al., 2012; Shaib & El-Serag, 2004).

Bei dem Großteil der Patienten, die ein Gallengangskarzinom entwickeln, kann kein direkter auslösender Faktor identifiziert werden. Jedoch wird durch das Vorliegen chronischer Inflammation die Entwicklung eines CCC begünstigt. Erkrankungen die zu solchen Entzündungen führen sind die primär sklerosierende Cholangitis, hepatobiliäre Parasitosen (durch *Oposthorchis viverrini* oder *Clonorchis sinensis*), eine Hepatocholedocholithiasis, das Caroli Syndrom oder die Exposition gegenüber dem Kontrastmittel Thorotrast. Auch virale Hepatitiden und Zivilisationserscheinungen wie zunehmendes Übergewicht, Diabetes mellitus sowie Tabak und Alkoholkonsum werden als weitere mögliche Risikofaktoren diskutiert (Bergquist & Von Seth, 2015; Blechacz, 2017).

Als einzige kurative Therapieoption existiert bislang nur die chirurgische Resektion der gesamten Tumormasse mit oder ohne zusätzlicher Radiochemotherapie. Dies ist jedoch aufgrund der meist erst spät im Krankheitsverlauf auftretenden Symptome und der damit verbunden Diagnose im fortgeschrittenen Stadium nur selten möglich (Blechacz et al., 2011). Aggressivere chirurgische und strahlentherapeutische Techniken haben zwar zu einer Verbesserung der R0-Resektionsrate beigetragen. Die Rezidivraten von bis zu 74% sowie Fünf-Jahres-Überlebensraten von maximal 33%

sind aber weiterhin Grund für die schlechte Prognose der Erkrankung (Ebata et al., 2012; Endo et al., 2008; Mihalache et al., 2010; Miwa et al., 2006).

1.2 Das entzündliche Tumorstroma

Der Zusammenhang zwischen Inflammation und Tumorentstehung sowie Tumorwachstum ist schon lange bekannt. Dieser wurde bereits von Rudolf Virchow vor 150 Jahren beschrieben. Wie das cholangiozelluläre Karzinom entstehen auch viele andere Tumore häufig auf dem Boden einer chronischen Entzündung (O'Hayre et al., 2008). Beim CCC kann dieser Entzündungsreiz zum Beispiel durch eine primär sklerosierende Cholangitis oder eine parasitäre Infektion ausgelöst werden (Shaib & El-Serag, 2004). Durch die lokale Schädigung des Gewebes kommt es zu einer Inflamationsreaktion mit Infiltration von unter anderem Lymphozyten, Monozyten und mesenchymalen Stammzellen (Sansone & Bromberg, 2011). Kennzeichen dieses Prozesses ist der Umbau der extrazellulären Matrix, die Ausbildung neuer Gefäße und der regelhafte Stopp des Vorgangs nach abgeschlossener Reepithelialisierung. Bei der Entstehung eines Malignoms ist dieser Vorgang gestört. Der Umbau erfolgt hier ohne zeitliche Limitation und überschreitet auch räumliche Grenzen. Die Tumormasse des CCCs besteht aus einer Mischung aus Karzinomzellen, Stromazellen wie Fibroblasten oder Endothelzellen sowie eingewanderter Immun- und Progenitorzellen (Gentilini et al., 2018). Dieses Mischgewebe aus Tumorzellen, eingewanderten Zellen und tumorcharakteristisch veränderter Extrazellulärmatrix mit einer ausgeprägten Kollagendisposition wird auch als desmoplastisches Tumorstroma bezeichnet. Neben diversen Zellen der angeborenen Immunantwort wie Makrophagen, natürlichen Killer Zellen oder dendritischen Zellen sowie adaptiven Immunzellen wie tumorinfiltrierenden Lymphozyten finden sich in diesem Gewebe auch tumorassoziierte Fibroblasten (TAFs). Diese sollen im Rahmen dieser vorliegenden Arbeit genauer betrachtet werden.

Es wird diskutiert, dass TAFs im Tumorgewebe das Mikroumfeld beeinflussen und damit zum weiteren Tumorwachstum und zur Invasion der Tumorzellen beitragen. Außerdem sollen sie ein Grund für die häufigen Medikamentenresistenzen von CCCs sein. All diese Funktionen sollen im Verbund mit anderen, assoziierten Zellen durch ein Netzwerk von parakrinen Signaltransduktionswegen vermittelt werden (Affo et al., 2017; Gentilini et al., 2018). So konnte bereits gezeigt werden, dass die Anwesenheit von TAFs im Tumorstroma cholangiozellulärer Karzinome mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet ist (Chuaysri et al., 2009; Sirica, 2012). Dabei bleibt der genaue Ursprung der TAFs unklar. Es wird davon ausgegangen, dass die TAFs aus hepatischen Sternzellen, gewebeständigen Fibroblasten oder eingewanderten Progenitorzellen aus dem Knochenmark aktiviert werden. Des Weiteren wird ein Ursprung durch epitheliale-mesenchymale Transition aus Cholangiozyten diskutiert (Brivio et al., 2017). Im Verlauf differenzieren diese Fibroblasten zu

Myofibroblasten, welche als ein charakteristisches Merkmal 'α-smooth muscle aktin' (αSMA) exprimieren (Wels et al., 2008). Dabei spielen eine Vielzahl von löslichen Mediatoren, welche sowohl von neoplastischen als auch von nicht-neoplastischen Zellen im Tumorstroma produziert werden, eine entscheidende Rolle für die Daueraktivität der TAFs (Östman & Augsten, 2009). Es entsteht ein sich selbst unterhaltendes System.

1.3 Bedeutung löslicher Mediatoren und ihre Signalwege im Tumorstroma von CCCs

Bei der Entwicklung eines Tumors spielen eine Vielzahl von löslichen Botenstoffen sowie deren entsprechende Rezeptoren und nachgeschalteten, intrazellulären Signalwege eine entscheidende Rolle. Auch bei der entzündungsabhängigen Karzinogenese des cholangiozellulären Karzinoms ist dies zu beobachten. Entsprechende Moleküle umfassen Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8), stromal derived factor-1 (SDF-1, CXCL12), CXCL14, platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor β (TGF-β), fibroblast growth factor (FGF), hepatocyte growth factor (HGF), granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), und insulin-like growth factor (IGF-1) (Östman & Augsten, 2009; Sirica, 2012; Thongchot et al., 2018). Das dies auch von klinischer Bedeutung ist konnte bereits gezeigt werden. So fanden sich in Proben von hochmalignen CCCs Überexpressionen von proinflammatorischen Molekülen wie Interleukin-6 und CXCR4 (Andersen et al., 2012).

Es ist bekannt, dass oben genannte Mediatoren ihre Wirkung in diversen Zellentypen über unterschiedliche Signaltransduktionswege vermitteln können. Kaskaden die hier eine Rolle spielen sind unter anderem der JAK/STAT-Weg, der JAK/Erk Weg oder der PI3K/Akt/mTOR Weg. Für diese drei Wege ist bekannt, dass sie die Gentranskription und Proteinsynthese beeinflussen und damit den Zellzyklusprogress, die Zellteilung, das Zellüberleben sowie den Metabolismus, die Invasion und die Angiogenese steuern. Die Aktivierung dieser Signalwege führt damit in verschiedenen Tumorzellen zu mehr Proliferation und Invasivität, bewirkt bei einigen Zellen einen Wechsel des Phänotypes hin zu mesenchymalen Differenzierungen und bietet damit auch Angriffspunkt für moderne Therapiekonzepte (Azare et al., 2011; Groner & von Manstein, 2017). Abbildung 1 zeigt eine vereinfachte Darstellung der durch parakrine Mediatoren beeinflussten Signalwege in CCC-Tumorzellen.

Bei CCC-Zellen wurde beobachtet, dass über SDF-1/CXCR4 vermittelt eine zunehmende Migration abhängig von der Aktivierung von Erk1/2 und Akt auftritt (Gentilini et al., 2012). Dieser Effekt kann auch Interleukin-6 vermittelt, beobachtet werden (Thongchot et al., 2018). Weiterhin ist bekannt, dass Myofibroblasten über die Aktivierung von Erk und STAT3 die Progression von CCC-Zellen fördern

(Clapéron et al., 2013) und eine erhöhte Aktivität des PI3K/Akt-Signalweges beim CCC zu einer höheren Rate an Metastasierungen führt (Yothaisong et al., 2013). Auch bei der medikamentösen Therapie des CCC finden diese Signalwege immer mehr Beachtung und könnten sich als mögliche, die chirurgische Resektion ergänzende, Optionen für eine therapeutische Intervention etablieren.

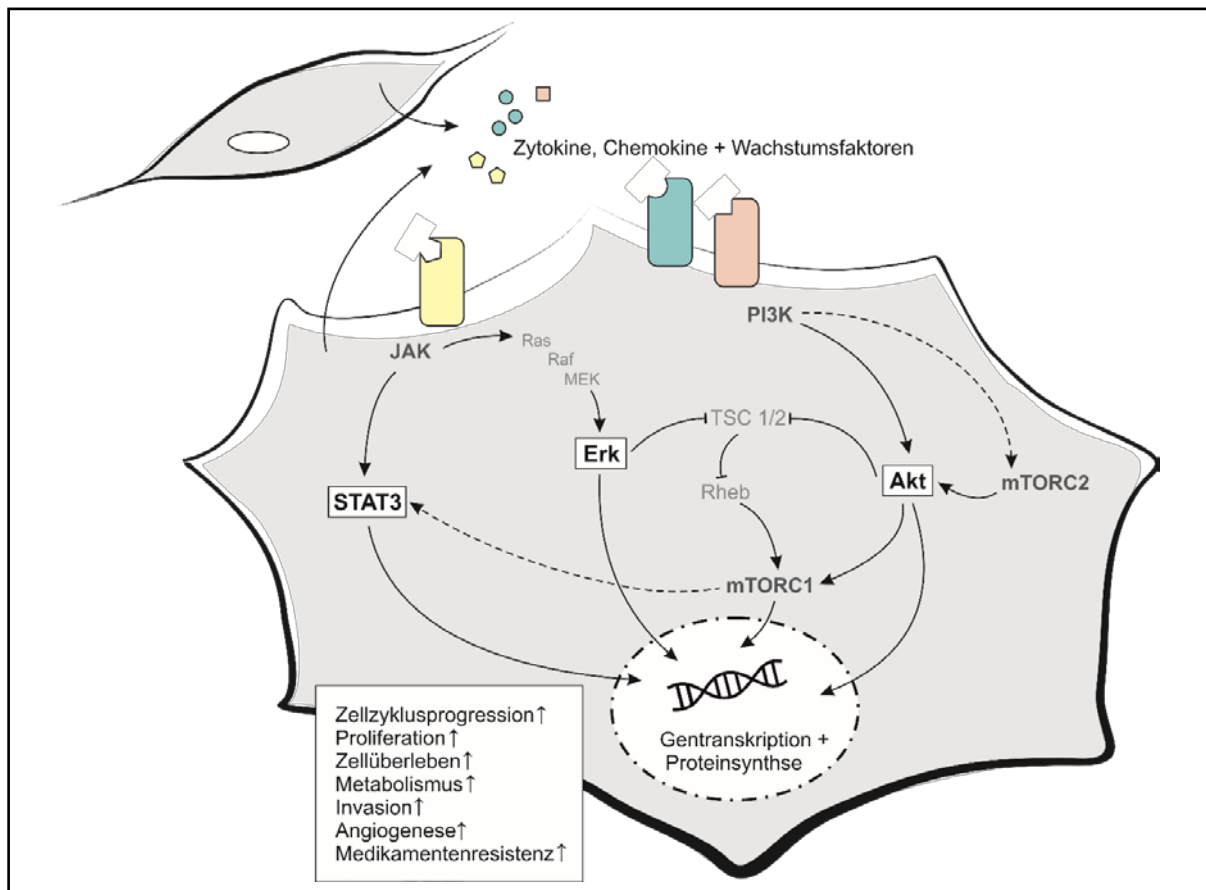


Abb. 1 Vereinfachte Darstellung der durch parakrine Mediatoren beeinflussten Signalwege in CCC-Tumorzellen und ihre Wirkung. Von TAFs werden Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren sezerniert. Diese binden an spezifische Rezeptoren auf CCC-Tumorzellen und aktivieren über Januskinasen (JAK) 'signal-transducer-and-activators-of-transcription' (STATs) oder über den Ras-Raf-MEK-Weg 'extracellular-signal-regulated-kinases' (Erk). Über Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) wird unter anderem direkt oder über den 'mechanistic-target-of-rapamycin-complex-2' (mTORC2) die Proteinkinase B (PKB oder Akt) aktiviert und damit zum einen direkt zum anderen über den 'mechanistic-target-of-rapamycin-complex-1' (mTORC1) die Gentranskription gesteuert. Dies kann ebenso wie die Aktivierung über STATs und Erk in einer gesteigerten Proliferation, Invasivität sowie eine erhöhte Medikamentenresistenz der Tumorzellen resultieren.

1.4 Lebertransplantation beim CCC

Es ist gut dokumentiert, dass der wichtigste Prognosefaktor für das phCCC das Erreichen einer kompletten Resektion mit tumorfreiem Schnittrand ist. Leider kann dies nur in einem Bruchteil der Fälle erreicht werden (Jarnagin et al., 2001). Frühe Versuche der orthotopen Lebertransplantation (oLTX) für Patienten mit CCC im letzten Jahrhundert wurden aufgrund sehr schlechter Resultate rasch wieder aufgegeben. Dank neuer, deutlich strikterer Auswahlkriterien der Patienten sowie eines begleitenden neoadjuvanten Radiochemotherapieprotokolls konnte jedoch in den letzten Jahrzehnten durch die oLTX eine vielversprechendere Prognose erreicht werden (Sapisochín et al., 2015). Eine Verbesserung der Fünf-Jahres-Überlebensraten auf bis zu 82% wurden dokumentiert (Schmeding & Neumann, 2013). Hierbei wurden Patienten mit lokal nicht-resektablem phCCC im frühen Stadium nach dem Mayo-Klinik Protokoll behandelt (De Vreede et al., 2000; Gores et al., 2013). Diese guten Überlebensraten zeigen eine deutliche Überlegenheit der oLTX gegenüber dem sonst üblichen palliativen Therapieansatz in dieser Patientengruppe (Gores et al., 2007). Durch eine Kombination der oLTX mit neoadjuvanter Radiochemotherapie kann das postoperative, rezidivfreie Überleben weiter verbessert werden (Darwish Murad et al., 2012).

Basierend auf den genannten Daten werden durch das aktuelle deutsche Transplantationsgesetz Lebertransplantationen beim CCC in engen Rahmen unterstützt. Entsprechend der Richtlinien der Bundesärztekammer ist eine Listung zur Lebertransplantation bei CCC möglich sofern: 1. Biliäre Strikturen in der Cholangiographie sowie der Nachweis einer Neoplasie in der Biopsie oder Zytologie erfolgt, 2. der Tumor technisch oder aufgrund der Lebererkrankung nicht resezierbar ist, 3. die Läsion sich im CT beziehungsweise MRT mit einem Durchmesser unter 3 cm darstellt und 4. keine intra- oder extrahepatischen Metastasen im CT/MRT von Thorax und Abdomen, sowie keine Beteiligung regionaler Lymphknoten nachweisbar ist. Außerdem sollen die Transplantationen im Rahmen prospektiver Studien erfolgen (Bundesärztekammer, 2019).

Zur Zeit gilt die Diagnose eines iCCA hingegen aufgrund weiterhin hoher Rezidivraten und kurzer Überlebenszeiten in den meisten Lebertransplantationszentren weltweit weiterhin als Kontraindikation (Bridgewater et al., 2014). Neuere Studien legen aber nahe, dass sich diese kategorische Ablehnung gegebenenfalls ändern könnte. So wurde beobachtet, dass bei Patienten die im Rahmen eines hepatozellulären Tumors (HCC) eine Lebertransplantation erhielten, sich histologische jedoch ein iCCC oder Mischtyp aus HCC und CCC herausstellte, ebenso einen deutlichen Zugewinn der mittleren, rezidivfreien- Überlebenszeit zu verzeichnen war (Machairas et al., 2019; Sapisochin et al., 2014).

Jedoch muss gerade im Hinblick auf den Mangel an Spenderorganen sowie die hohe Ko-Morbidität, die mit einer Organtransplantation einhergeht, der Gesamtnutzen einer Lebertransplantation bei CCC-

Patienten abgewogen werden. Der Empfehlung der Bundesärztekammer des Einschlusses aller transplantierten Patienten in prospektive Studien kann man sich in Anbetracht der bislang noch immer geringen Datenlage jedoch nur anschließen. Eine standardmäßige Erfassung der verwendeten Immunsuppression erfolgt bislang jedoch noch nicht.

1.5 Die Rolle von immunsuppressiver Therapie nach oLTX beim CCC

In den letzten Jahren sind verschiedene neue Wirkstoffe zur systemischen Therapie beim CCC in Erprobung (Massironi et al., 2020). Angesichts der besseren Überlebenszeiten wird die orthotopie Lebertransplantation bei sonst inoperablen phCCC als mögliche, experimentelle Behandlungsoption zwar selten, aber durchaus alternativ durchgeführt (Gulamhusein & Sanchez, 2015). Wie bei jeder Organtransplantation muss sich an die erfolgreiche Operation eine suffiziente Immunsuppression zur Prävention einer Abstoßungsreaktion anschließen. Medikamente die dabei Verwendung finden sind unter anderen Kortikosteroide, Calcineurininhibitoren wie Tacrolimus oder Cyclosporin A (CsA), Inhibitoren der Monophosphat Dehydrogenase wie Mycophenolsäure (MPA) und deren Prodrugs, Inhibitoren des 'mechanistic-target-of-rapamycin' (mTOR) wie Sirolimus oder Everolimus, Interleukin-2 Antagonisten wie Basiliximab sowie Anti-T-Zell-Antikörper (Gotthardt et al., 2014; Verna et al., 2020).

Der Gebrauch immunsuppressiver Wirkstoffe bei Krebspatienten wird normalerweise vermieden. Dies ist der Vermutung geschuldet, dass durch deren Einsatz die Tumorprogression unterstützt wird. Dennoch haben verschiedene Wirkstoffe, die normalerweise in die Gruppe der Immunsuppressiva eingeordnet werden, in den letzten Jahren einen vielversprechenden Effekt in der Anti-Tumor-Forschung gezeigt. Einer der besonderen Angriffspunkte für solche vorteilhaften Medikamente, die zur Immunsuppression nach Lebertransplantation eingesetzt werden können, ist mTOR. Die Aktivierung von mTOR führt unter anderem zu einer verstärkten Tumorprogression und Expression von Angiogenesefaktoren über die Proteinkomplexe mTORC1 und mTORC2. Dabei führt die Aktivität mTORC1 zu einer direkten Induktion der Proteintranslation, der Synthese von Nukleotiden und aktiviert wiederum 'Signal-transducer-and-activator-of-transcription' (STAT3). mTORC2 kann selbst auch über Wachstumsfaktoren stimuliert werden und aktiviert wiederum die Proteinkinase B (PKB oder Akt). Dadurch tragen beide Komplexe zur Tumorgenese bei (Tian et al., 2019). Inhibitoren dieser Komplexe (Rapamycin und Rapamycin-Analoga) haben in den letzten Jahren bereits Verwendung in der Tumorthherapie gefunden. Beispielsweise konnte durch deren Einsatz eine Reduktion der Progression von inoperablen Lebertumoren sowie eine Verlängerung des Langzeitüberlebens gezeigt werden (Ling et al., 2020; Okada et al., 2009; Rizell et al., 2008). In vitro wird unter anderem eine Reduktion der Motilität sowie im Tiermodell eine Reduktion der peritonealen Dissemination verschiedener CCC-Zelllinien nach Einsatz von Rapamycin beobachtet (Hong et al., 2013). Ein Vertreter dieser

Wirkstoffklasse ist Everolimus. Dieser bietet als bereits zugelassenes Medikament schon seit einigen Jahrzehnten aufgrund seines positiveren pharmakokinetischen Profils und eines anderen Nebenwirkungsspektrums ein weiteres Werkzeug in der immunsuppressiven und Anti-Tumor Therapie (Faivre et al., 2006; Kirchner et al., 2004; ter Heine et al., 2018; Zhou & Huang, 2012).

Eine weitere Wirkstoffklasse, die sich sowohl in der immunsuppressiven Therapie als auch durch antitumorale Effekte auszeichnet, sind Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) -Hemmer wie Mycophenolsäure (MPA) oder dessen Prodrug Mycophenolatmofetil. Durch die Blockade von IMPDH wird die De-novo-Synthese von Guanodinukleotiden und damit auch die DNA- und RNA-Synthese gehemmt (Allison & Eugui, 2005; Morath et al., 2006). IMPDH hat dabei zwei unterschiedliche Isoformen: IMPDH1 und IMPDH2. IMPDH1 wird hauptsächlich in normalen Leukozyten und Lymphozyten exprimiert und erklärt damit den immunsuppressiven Effekt von MPA. IMPDH2 hingegen wird vorwiegend in stark proliferierenden Zellen sowie Tumorzellen hochreguliert vorgefunden (Duan et al., 2018; Nagai et al., 1992). Dabei wird zum Beispiel in Kolonkarzinomzellen der Zellzyklusprogress durch eine Stimulation der Proteinkinase B (Akt) durch IMPDH2 vorangetrieben (Duan et al., 2018). Weiterhin wurde bereits beschrieben, dass IMPDH auch darüber hinaus als Zellzyklusregulator wirken kann, indem es Histongene unterdrückt und andere Transkriptionsfaktoren bindet (Kozhevnikova et al., 2012). Der Fakt, dass gerade IMPDH2 in verschiedenen Tumoren mit Zellproliferation, Differenzierung und Chemoresistenz assoziiert ist, macht es dabei zu einem interessanten Ziel möglicher Anti-Tumor Strategien (Fellenberg et al., 2007; Ishitsuka et al., 2005; Peñuelas et al., 2005). MPA konnte dabei in verschiedenen Studien sowohl in-vitro als auch in-vivo einen Effekt auf die Zellproliferation sowie auf die Induktion von Apoptose zeigen (Görtz et al., 1997; Takebe et al., 2006; Végso et al., 2007).

Als eine der am häufigsten nach Lebertransplantation eingesetzten Immunsuppressiva sind die Calcineurininhibitoren mit den Vertretern Tacrolimus oder Cyclosporin A (CsA) unersetzlich. Diese bilden intrazelluläre Komplexe mit Cyclophilin. Dieser Komplex hemmt die Proteinphosphatase Calcineurin, welche dadurch an der Dephosphorylierung von 'nuclear factor of activated T-cells' (NF-AT) gehindert wird. NF-AT kann damit nicht mehr als Transkriptionsfaktor für die Synthese von pro-inflammatorischen Zytokinen wie Interleukin 2 (IL-2), Interleukin 4 (IL-4), Interferon γ und 'transforming growth factor β ' (TGF- β) dienen. Eine Aktivierung durch antigenpräsentierende Zellen ist nicht mehr möglich (Jain et al., 1992; Marsland & Griffiths, 2002). Der Einfluss von Calcineurininhibitoren auf Tumorzellen wird hingegen kontrovers diskutiert. Fall-Kontrollstudien konnten einen Rückgang des Risikos für Rektumkarzinome und Mammakarzinome für Patienten unter Therapie mit Calcineurininhibitoren feststellen (Stewart et al., 1995, 1997). In in-vitro Studien konnte außerdem ein Rückgang der Proliferation und Migration in Harnblasen- und Prostatatumorzellen

nachgewiesen werden (Kawahara, Kashiwagi, Ide, Li, Zheng, Ishiguro, et al., 2015; Kawahara, Kashiwagi, Ide, Li, Zheng, Miyamoto, et al., 2015). Im Gegensatz dazu stehen Untersuchungen bei Transplantationspatienten, bei denen ein erhöhtes Tumorrisiko, besonders für Hauttumore und Lymphome sowie Nierenzellkarzinomen festgestellt wurde (Fung et al., 2001; Tremblay et al., 2002). Außerdem wird Cyclosporin A auch direkt mit zunehmendem Tumorwachstum durch eine erhöhte Produktion von TGF- β , Interleukin 6 (IL-6) oder 'vascular endothelial growth factor' (VEGF) (Hojo et al., 1999), die Aktivierung des G-Proteins Ras (Datta et al., 2009) sowie der Proteinkinase Akt (Han et al., 2010) in Verbindung gebracht.

Der Einfluss der immunsuppressiven Therapie mit Medikamenten dieser Wirkstoffgruppen auf das Zusammenspiel von CCC-Zellen und TAFs, gerade unter dem Blickwinkel einer möglichen Lebertransplantation bei nicht-resektablem CCC, ist aber bislang noch wenig erforscht.

2 Arbeitshypothese und Zielsetzung

Cholangiozelluläre Karzinome (CCC) weisen einen hohen Anteil an desmoplastischem Stroma auf. Durch das dort vorherrschende, entzündliche Tumormilieu mit der Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren durch tumorassoziierte Zellen kommt es zur Stimulation der Tumorzellen. Dies resultiert in einer beschleunigten Tumorprogression, einer verstärkten Tumorzellinvasion und einer Medikamentenresistenz gegenüber Chemotherapeutika. Zu diesen tumorassoziierten Zellen zählen unter anderem alpha-smooth-muscle Actin exprimierende, tumorassoziierte Fibroblasten (TAFs), welche in CCCs besonders zahlreich vorkommen. Weiterhin ist die Prognose aufgrund der häufig späten Diagnose in einem lokal nicht-resektablem Stadium schlecht. Eine therapeutische Option, die sich bei Patienten mit phCCC ohne Metastasierung ergibt, ist die orthotope Lebertransplantation. Daran muss sich zwangsläufig eine immunsuppressive Therapie zu Prävention einer Abstoßungsreaktion anschließen. Die Wahl eines passenden Immunsuppressivums gestaltet sich dabei aufgrund des Nebenwirkungsspektrums schwierig und muss im individuellen Einzelfall angepasst werden. Die Wirkung dieser dennoch notwendigen, immunsuppressiven Therapie auf die CCC-Zellen sowie die TAFs ist dabei bislang noch wenig untersucht.

Ziel dieser Arbeit soll es daher sein durch die Untersuchung zu den Effekten von immunsuppressiver Therapie auf CCCs und TAFs die Entscheidungsfindung für eines dieser Medikamente im Einzelfall, durch weitere Argumente bezüglich deren antitumoralen Effekte zu unterstützen. Zu diesem Zweck sollen primäre Fibroblasten aus Exzidaten von Patienten mit CCC isoliert und bezüglich ihrer Wirkung auf die zwei CCC-Zelllinien TFK-1 und HuCCT-1 hin untersucht werden. Zudem soll die Wirkung typischer Vertreter immunsuppressiver Therapie in diesem Setting auf die Proliferation und Invasion der CCC-Zellen betrachtet werden. Im Fokus dieser Arbeit sollen dabei der Calcineurininhibitor Cyclosporin A (CsA), der Inhibitor der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase Mycophenolsäure (MPA) sowie der mTOR-Inhibitor Everolimus stehen.

3 Materialien

3.1 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Quelle
HuCCT-1	Humanes intrahepatisches CCC	Cell Bank RIKE Bio Resource Centre (Japan)
TAFs	Lebertumorresektat von Patienten mit intrahepatischem CCC	Klinik für Allgemeine, Viszeral-, Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie, UKSH, Campus Kiel
TFK-1	Humanes extrahepatisches CCC	Cell Bank RIKE Bio Resource Centre (Japan)

3.2 Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Lösungsmittel	Hersteller
Akt (pan) mAb	Maus	1:1000	5% BSA in TBS-T	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)
p44/42 MAPK (Erk1/2)	Kaninchen	1:1000	5% BSA in TBS-T	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)
Anti mouse Dako EnVision+ System-HRP Labelled Polymer	Ziege	gebrauchsfertig	keines	DAKO North America, Inc. (Carpinteria, CA, USA)
Anti mouse IRDye 680 IgG	Ziege	1:10.000	0,5 % Milch TBS-T 0,01% SDS	LI-COR (Lincoln, USA)
Phospho-Akt (Ser473) (193H12) mAb	Kaninchen	1:1000	5% BSA in TBS-T	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (E10) mAb	Maus	1:5000	5% BSA in TBS-T	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)
Anti rabbit IRDye 800CW IgG	Ziege	1:10.000	0,5 % Milch TBS-T 0,01% SDS	LI-COR (Lincoln, USA)
Panzytokeratin Klon KL1 mAb	Maus	1:1000	AK-Verdünnungspuffer	Immunotech SAS (Marseille, Frankreich)
Phospho-Stat3 (Tyr705) Antibody	Kaninchen	1:300	5% BSA in TBS-T	Cell Signaling Technology (Leiden, Niederlande)
β-Actin mAb Klon AC-15	Maus	1:10.000	0.5% Milch In TBS-T	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)

Stat3 (124H6) mAb	Maus	1:1000	5% BSA in TBS-T	Cell Signaling Technology (Leiden, Niederlande)
Vimentin (V9): (sc-6269) mAb	Maus	1:50	AK-Verdünnungspuffer	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA)
A-Smooth Muscle actin (A5247) mAb	Maus	1:800	AK-Verdünnungspuffer	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)

3.3 Chemikalien und Reagenzien

Reagenzien/Chemikalien	Hersteller
Accutase	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Aceton	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Aquatex Eindeckmittel	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg, Deutschland)
BSA, Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Complete Ultra protease inhibitor	ROCHE AG (Basel, Schweiz)
DAB Chromogen (3,3'-Diaminobenzidine)	Dako Denmark A/S (Glostrup, Dänemark)
DMEM (Dulbeccos modified Eagle Medium)	Gibco Invitrogen (Grand Island, New York, USA)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
DPBS (Dulbeccos Phosphate Buffered Saline)	Gibco Invitrogen (Grand Island, New York, USA)
DTT	Biomol (Hamburg, Deutschland)
Eosin	Waldeck (Münster, Deutschland)
FCS (fetales Kälberserum)	Gibco Invitrogen (Grand Island, New York, USA)
GlutaMAX	Gibco Invitrogen (Grand Island, New York, USA)
Glycerol	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Glycin	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Hämalaun (Mayer)	Waldeck (Münster, Deutschland)
Hematoxylin	Dako Denmark, A/S (Glostrup, Dänemark)
IGEPAL AL CA 630	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Isopropanol	Fischer (Sarbrücken, Deutschland)
Kristallviolett	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Matrigel (Basement membrane Matrix)	BD Medical Systems (Franklin Lakes, New York, USA)
Methanol	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Milchpulver Blotting-Grade	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
NaCl	Avantor (Center Valley, USA)
Penicillin/Amphotericin/Streptomycin	Gibco Invitrogen (Grand Island, New York, USA)

Peroxidase Blocking Solution S2023	Dako Denmark A/S (Glostrup, Dänemark)
PhosSTOP EASY	ROCHE AG (Basel, Schweiz)
Precision Plus Protein Dual Color Standards	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
RPMI 1640 Kulturmedium	Gibco Invitrogen (Grand Island, New York, USA)
SDS	Biomol (Hamburg, Deutschland)
SDS 20%	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Sorafenib (in DMSO gelöst)	Bayer AG (Leverkusen, Deutschland)
Substrate Buffer (B)	Dako Denmark A/S (Glostrup, Dänemark)
Tris Base ULTROL Grade	Calbiochem (Bad Soden, Deutschland)
Tris-HCl	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Trypanblau Färbung 0,4%	Gibco Invitrogen (Grand Island, New York, USA)
Trypsin	Gibco Invitrogen (Grand Island, New York, USA)
Tween 20	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)

3.4 Kits

Kit	Hersteller
DC Protein Assay Kit	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Proteome Profiler™ Array Human Cytokine Panel Array A	R&D Systems Inc. (Minneapolis, USA)

3.5 Puffer

Puffer	Hersteller/Zusammensetzung
Antikörper Verdünnungspuffer	DCS GmbH & Co. KG (Hamburg, Deutschland)
Blotting Puffer	14,26g Glycin 12,114g Tris-Base ad 1L mit aqua dest
Lämmli Puffer 4x	10mL 1M Tris-HCl (pH 6,8) 16mL Glycerol 100% 3,2g SDS 1,23g DTT Bromphenolblau ad 1L mit aqua dest
Laufpuffer	3,029g Tris-Base 14,41g Glycin 50mL 20% SDS ad 1L mit aqua dest
RIPA Puffer	50mM Tris-HCl (pH 7,5) 150mM NaCl 1% IGEPAL CA 630 0,5% NaDesoxycholat 0,2% SDS
Sammelpuffer	6,0725g Tris-Base 20mL 20% SDS ad 1L aqua dest (pH 6,8)

TBS	8g NaCl 2,42g Tris-Base ad 1L aqua dest (pH 7,6)
TBS-T	8g NaCl 2,42g Tris-Base ad 1L aqua dest (pH 7,6) + 0,1% Tween20
Waschpuffer (20x)	DCS GmbH & Co. KG (Hamburg, Deutschland)

3.6 Arzneimittel

Arzneimittel	Lösungsmittel	Hersteller Trockensubstanz
Cyclosporin A Sandimmun®	DMSO	Novartis
Everolimus (RAD 001)	DMSO	Novartis
Mycophenol-Säure Myfortic®	Methanol	Novartis

3.7 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Deckgläser 24x60 mm	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, Deutschland)
Falcon-Röhre 50 ml	Sarstedt (Newton, USA)
Filter Tips (10µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	Sarstedt (Newton, USA)
Immobilon FL Transfer Membrane	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Membraninserts 8µm Poren	BD Falcon (BD, Franklin Lakes, New York, USA)
Objektträger 25x75 mm	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, Deutschland)
PAP Pen	Abcam (Cambridge, UK)
Petrischale TC 150	Sarstedt (Newton, USA)
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1 ml, 2 ml	Sarstedt (Newton, USA)
Serologische Pipetten (2ml, 5ml, 10ml, 25ml)	Sarstedt (Newton, USA)
Wedge Well 4-20% Tris Glycin Gel	Invitrogen (Novex) (New York, USA)
Whatman-Papier	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Zellkultur Lochplatten (6-, 24-, 96-Well)	Sarstedt (Newton, USA)
Zellkulturflaschen (T75, T175)	Sarstedt (Newton, USA)
Zellschaber (25cm)	Sarstedt (Newton, USA)

3.8 Geräte

Gerät	Hersteller
8-Kanal-Pipette (3000µl)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Abzug (Medizinbox MB85)	Berner International (Elmshorn, Deutschland)
Agarosegelelektrophoresekammer Sub cell GT	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Aquadest Anlage (MILLI-Q Reagent water system)	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Autoclav (CS-Labor 91782)	Webeco (Selmsdorf, Deutschland)
Centrifuge 5415R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
CO2-Inkubator (FORMA CO2 Water Jacketed Incubator)	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)

Consort EV 243 Electrophoresis power supply	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
CURIX 60 Entwickler	AGFA (Mortsel, Belgien)
Einkanalpipetten (10µl, 100µl, 1000µl)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Flüssigkeitspumpe	KNF (Freiburg, Deutschland)
Mikrotiterplattenphotometer (TECAN Sunrise Reader)	Tecan Group (Männedorf, Schweiz)
Heraeus Minifuge T	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
Inkubationsbad 1003	Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel, Deutschland)
Mikroskop Olympus CK2	Olympus (Tokyo, Japan)
Multipette plus Stepper	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Nalgene-Einfriebehälter	Thermo Scientific (Schwerte Deutschland)
Neubauer Zählkammer	Laboroptik (Lancing, UK)
Odyssey Infrared Imager	LI-COR (Lincoln, USA)
Pipetus (Pipetboy)	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, Deutschland)
Power supply PowerPac 3000	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Schüttler Duomax 1030	Heidolph Instruments (Schwabach, Deutschland)
Sterilbank Biological Safety Cabinets	NUAIRE (Plymouth, USA)
Stuart Rollenmixer SRT9	Bibby Scientific Ltd (Stone, UK)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Vortex Genie 2	Bender und Hobein AG (Zürich, Schweiz)
Vortex Mixer (Vortex Genie 2)	Scientific Industries (New York, USA)
Waage Sartorius BL 3100 + BP310S	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
XCell Blot Module	Invitrogen (Novex) (New York, USA)
XCell Mini-Cell Sure Lock Electrophoresis Cell	Invitrogen (Novex) (New York, USA)

4 Methoden

4.1 Zellkultur

Verwendet wurden die intrahepatische CCC-Zelllinie HuCCT1, die extrahepatische CCC-Zelllinie TFK-1 sowie tumorassoziierte Fibroblasten, welche wie unten beschrieben aus Patientenproben generiert wurden. Die Zellen wurden in 175cm² Zellkulturflaschen bei 37°C bei 5 prozentiger CO₂-Atmosphäre unter Verwendung von etwa 35ml des Zellkulturmediums kultiviert. Dabei wurde für die Monokulturversuche der CCCs RPMI mit 10% FCS, 1% Glutamaxx und 1% Pyruvat und für die Monokulturversuche der TAFs sowie für die Stimulationsversuche der CCCs und die Co-Kulturversuche DMEM zuzüglich der gleichen Supplemente verwendet.

Etwa alle drei Tage im Falle der Tumorzellen, beziehungsweise alle fünf Tage im Falle der TAFs, wurde das Medium abgesaugt und nach einmaliger Waschung der Zellen mit PBS durch frisches Medium ersetzt. Bei Erreichen einer Zellkonfluenz von etwa 70-80% wurden die jeweiligen Zelllinien abgelöst und in unterschiedlichen Verhältnissen in neue 175cm² Flaschen gegeben. Tumorzellen wurden in der Regel 1:5 geteilt, TAFs 1:2. Hierzu wurde das Medium entfernt, die Kulturflaschen mit 10 ml PBS gewaschen und im Falle der CCCs für wenige Minuten mit 10ml 10%-igem Trypsin in PBS, im Falle der TAFs mit Accutase inkubiert. Nach lichtmikroskopisch sichtbarem Ablösen der Zellen wurde die Zellsuspension mit 10ml FCS-haltigem Medium gemischt und bei 1420rpm vier Minuten bei 37°C zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in passendem Medium resuspendiert und auf neue Kulturflaschen verteilt.

Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen wie oben beschrieben abgelöst und zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet in 1ml Einfrierlösung (10% DMSO in FCS) resuspendiert und in einem Kryoröhrchen in einem Isopropanolbad auf -80°C abgekühlt. Anschließend konnten die Zellen in flüssigem Stickstoff eingelagert werden. Zum Auftauen wurde das Kryoröhrchen im Wasserbad auf 37°C erwärmt, anschließend zentrifugiert und das Einfriermedium entfernt. Das Zellpellet wurde in entsprechendem Medium gelöst und zum weiteren Wachstum in eine 175cm² Zellkulturflasche überführt.

Zur Zellzahlbestimmung wurden aus den Zellsuspension 10µl entnommen und mit 10µl Trypanblau bei den Fibroblasten und mit 90µl bei Tumorzellen gemischt. Anschließend wurden die vier Quadranten einer Neubauerzählkammer mit der Lösung befüllt die Zellen pro Quadrat unter dem Mikroskop ausgezählt. Die anschließende Berechnung der Zellzahl erfolgte nach der Formel:

$$[\text{Summe der Zellzahlen der vier Quadrate}] / 4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

4.2 Isolierung primärer Fibroblasten

Makroskopisch besonders stromareiches Tumorgewebe (Primärtumore und Lebermetastasen) wurde nach Resektionsoperationen von verschiedenen intra- oder extrahepatischen Cholangiozellulären Karzinomen mit dem Einverständnis der Patienten zur weiteren wissenschaftlichen Forschung entnommen. Unter sterilen OP-Bedingungen erfolgte der grobe Zuschnitt und die sofortige Aufnahme in 50ml-Reaktionsgefäße mit DMEM unter Zusatz von 10% FCS, 1% Amphotericin B, 1% Penicillin und 1% Streptomycin, 1% GlutaMax und 1% Pyruvat. Anschließend wurde das Gewebe unter Laborbedingungen in Stücke mit circa 1mm Kantenlänge zerlegt und trocken in 6-Well Platten gelegt. Nach 10 Minuten Trockenzeit zur Anheftung wurde vorsichtig DMEM Medium mit oben genannten Zusätzen hinzugegeben bis die Tumorstücke vollständig bedeckt waren. Es erfolgte die Kultivierung unter den bereits beschriebenen Zellkulturbedingungen. Nach dem Aussprießen der tumorassoziierten Fibroblastenkolonien auf die Böden der 6-Well Platten konnten die Gewebestücke nach wenigen Tagen entnommen und verworfen werden. Nach weiterem Wachstum bis zu einer Konfluenz von etwa 80% erfolgte die Ablösung der Fibroblasten mit Accutase und die weitere Kultivierung in 175cm² Zellkultur Flaschen zur Expansion. Tumorassoziierte Fibroblasten fanden für Versuche bis zur maximal 15. Passage Verwendung.

4.3 Objektträgerkulturen und Charakterisierung der tumorassoziierten Fibroblasten

Zur immunchemischen Charakterisierung der Zellen erfolgte die Aussaat von je 25.000 Zellen gelöst in 100µl Medium als Tropfen auf thermisch sterilisierten Glasobjektträgern und die Positionierung der Objektträger in einer Petrischale. Nach visueller Kontrolle der Zelladhärenz nach etwa 4 Stunden wurden die Schalen mit DMEM inklusiver Zusätze geflutet und die Zellen für weitere 24 Stunden unter den beschriebenen Bedingungen kultiviert. Anschließend konnten die Objektträger getrocknet bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert werden. Vor einer weiteren Verwendung der Objektträger wurden die Zellpopulationen mit einem PAP-Pen umrandet.

Es erfolgte die Fixierung der Zellen auf den Objektträgern mit Aceton, die Waschung mit PBS und die Blockung endogener Peroxidasen mittels Peroxidase Blocking Solution S2023. Nach erneuter Waschung erfolgte die Inkubation mit den primären Antikörpern gegen Vimentin, Panzytokeratin (KL-1) und alpha-smooth-muscle actin (α SMA) für 30 Minuten. Als Negativkontrolle erfolgte die Inkubation in Waschpuffer. Vor und nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper Dako EnVision+System- HRP Labelled Polymer für weitere 30 Minuten erfolgten erneute, schrittweise Waschungen. Zur Detektion wurden die Zellen mit DAB Chromogen Lösung (20µl DAB Chromogen in 980µl substrat buffer) und Haematoxylin (1:7 in Leitungswasser) für 7 Minuten gefärbt. Nachdem die Objektträger erneut mit Leitungswasser und destilliertem Wasser gespült wurden, wurden diese anschließend mit einem

Tropfen Aquadex Eindecklösung und einem Deckgläschen eingedeckelt. Es erfolgte eine optische Auswertung und Fotodokumentation unter dem Lichtmikroskop zur Archivierung.

4.4 Tumorzelllinien

Sowohl die extrahepatische CCC-Zelllinie TFK-1 als auch die intrahepatische CCC-Zelllinie HuCCT-1 wurden über die japanische JCRB Zellbank (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank) käuflich erworben. Als Kontrolle der immunhistochemischen Färbung der TAFs wurden die humane Vorhautfibroblasten Zelllinie KiF-5 als Beispiel für Zellen eines mesenchymalen Ursprungs verwendet. Diese Zelllinie wurde bereits zuvor in unserem Labor etabliert und erstmal von Lehnert et al. 2001 beschrieben. Die Zelllinie T3M-4, auch bekannt unter Panc89, wurde als Beispiel epithelialer Zellen verwendet. Diese Zelllinie wurde ursprünglich von Herrn Tetsuro Okabe aus Tokyo bezogen und kann heute über die RIKEN BRC Zellbank (RIKEN BioResource Research Center) erworben werden.

4.5 Gewinnung von Fibroblasten-konditioniertem Medium (KM)

Zur Herstellung von Fibroblasten-konditioniertem Medium wurde das Zellkulturmedium von mit TAFs konfluenten T175-Kulturflaschen entfernt und die Zellen 2x mit PBS gespült. Anschließend wurden 20ml frisches FCS freies-DMEM aufgebracht und die Zellen unter den gewohnten Kulturbedingungen inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium mehrerer Flaschen gesammelt, gepoolt, in 50ml-Reaktionsgefäße überführt und bei 1500rpm für 5 Minuten zentrifugiert um eventuelle Zellfragmente zu entfernen. Ohne das Zellpellet zu resuspendieren wurden die oberen zwei Drittel des Überstandes vorsichtig in ein neues 50ml-Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.6 Co-Kultur im modifizierter Boydenchamber Assay 48h

Zur kombinierten Untersuchung der Beeinflussung des Proliferations- und Migartionsverhaltens von CCCs durch tumorassoziierte Fibroblasten verwendeten wir ein modifizierten Boydenchamber-Assay. Dies ermöglicht die kombinierte Untersuchung der gerichteten Migration der Tumorzellen in einem 3D-Modell durch eine mit Poren versehene Membran sowie die anschließende, lokale Proliferation. Wir führten die Versuche in einem parakrinen Ko-Kultur Setting, mit den CCCs Zellen im einliegenden Insert und den TAFs im Well, durch. Außerdem lief in einem simultanen Versuchsaufbau die Untersuchung ohne das Vorhandensein von TAFs im unteren Well. Stattdessen fand hier als Stimulanz konditioniertes TAF-Medium (KM) bzw. 10% FCS haltiges Medium Verwendung. Als Referenz wurde eine unstimulierte Kontrolle verwandt.

Für die Ko-Kultur Ansätze wurden bereits am Vortag der Versuche 25.000 TAFs in den entsprechenden 24-Well Platten ausgesät. Die zu verwendenden Tumorzellen wurden am Vortag der Versuche mehrfach mit PBS gewaschen und erhielten anschließend für 24 Stunden FCS-freies DMEM. Für den Boydenchamberassay verwendeten wir Transwellinserts mit einer Porengröße von 8µm für ein 24-Well Format. Diese Inserts wurden am Tag des Versuchsstarts mit 500µl Matrigel (1mg/l) beschichtet und für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Währenddessen wurden die am Vortag für den entsprechenden Versuch vorbereiteten 24-Well Platten mit FCS-freiem Medium gewaschen. Nach der Inkubationszeit erhielten auch die Inserts eine Waschung mit FCS-freiem Medium. Anschließend wurden die Inserts in die vorbereiteten Platten gesetzt. Es folgte die Zugabe von 50.000 Tumorzellen in das Insert sowie die Zugabe von FCS-freiem DMEM. Dabei wurden 900µl in die Wells sowie 300µl in die Inserts pipettiert. Im Falle des Versuchsansatzes ohne TAFs wurde dementsprechend entweder FCS haltiges DMEM beziehungsweise fibroblastenkonditioniertes Medium an dieser Stelle verwendet.

Nach 48 Stunden Inkubation bei Standardbedingungen wurden die Inserts mit Hilfe einer sterilen Pinzette in eine neue, mit 4%-iger Paraformaldehydlösung gefüllten 24-Wellplatte umgesetzt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde die Lösung abgesaugt und die Inserts mit destilliertem Wasser gespült. In einer weiteren 24-Well-Platte wurden 500µl Hämalaunlösung und 500µl Eosinlösung vorgelegt. Zunächst wurden die Inserts für 30 Minuten in Hamalaun gefärbt. Nach dem Waschen der Inserts mit Wasser wurde die Innenseite vorsichtig mit einem Wattestäbchen ausgewischt und mit Wasser gespült um den inneren Zellrasen zu entfernen. Nach einer kurzen Gegenfärbung mit Eosin erfolgte ein letzter Waschschrift. Um eine Austrocknung der Membran zu verhindern wurden die Inserts in mit 500µl Wasser gefüllten 24-Well-Plattenlöchern gelagert und mit ebenfalls 500µl destilliertem Wasser gefüllt. Die Quantifizierung der durch die Membran gewanderten Zellen erfolgte durch Auszählung von jeweils drei zufällig ausgewählten Sichtfeldern pro Insert und Well, welche bei 100er-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop fotografiert wurden.

Das Ergebnis der Zählung der unstimulierten Tumorzellen wurde im Weiteren als Kontrolle gleich 1 und die Ergebnisse der stimulierten Ansätze dazu ins Verhältnis gesetzt.

Der Versuch wurde mit je zwei biologischen Replikaten und je zwei technischen Replikaten durchgeführt.

4.7 Messung der Zytokinexpression

Zur Bestimmung der sezernierten Zytokine im konditioniertem Medium wurde der Proteome Profiler™ Human Cytokine Panel Array A verwendet. Mit dessen Hilfe können auf einer speziellen Nitrozellulose Membran 36 spezifische humane Zytokine detektiert werden. Zur Durchführung des Versuches wurde

die Membran für eine Stunde in 2 ml des mitgelieferten Array-Puffers-4 auf dem Laborschüttler inkubiert. Parallel wurden 1 ml des konditionierten TAF-Mediums mit 0,5 ml des Array-Puffers-4 gemischt und anschließend 15µl des Detektionsantikörpergemischs hinzugegeben und bei Raumtemperatur ebenfalls auf dem Schüttler für eine Stunde inkubiert. Nach der Entfernung der Pufferlösung von der Membran wurde das Probengemisch aufgetragen und für eine Inkubation über Nacht auf den Schüttler gestellt. Am Folgetag erfolgte dann die zehnminütige Waschung mittels Zugabe von 20ml des mitgelieferten Waschpuffers auf dem Schüttler. Anschließend wurde die Membran mit Streptavidin-Horseradish-Peroxidase inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Membran auf eine Plastikfolie gegeben, je 1ml der Chemolumineszenzreagenzien aufgebracht und eine weitere Plastikfolie daraufgelegt. Nach dem Ausstreichen von Luftblasen wurde nach einer Minute die Plastikfolie entfernt und überschüssige Flüssigkeit mit einem Löschpapier entfernt. Anschließend wurde eine neue Plastikfolie aufgelegt und ein Röntgenfilm für 120 Sekunden belichtet. Zur Archivierung wurden die belichteten Röntgenfilme hochauflösend eingescannt und gespeichert. Die Auswertung erfolgt mittels der vom Hersteller mitgelieferten Matrix. Diese kann auf den Röntgenfilm darübergelegt und mitgescannt werden und ermöglicht so die Zuordnung der Signale zu den entsprechenden Zytokinen.

4.8 Stimulation der CCCs mit KM – Proteinbiochemische Methodik

4.8.1 Stimulation der Zellen mit KM

Nachdem 3×10^5 Karzinomzellen je Loch einer 6-Well Platte ausgesät und für 24 Stunden in FCS haltigem DMEM bei den üblichen Kulturbedingungen inkubiert wurde, wurden die Zellen mehrfach mit PBS gewaschen und das Medium gegen FCS freies Medium ausgetauscht. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte eine weitere Waschung mit PBS. Anschließend wurden die Zellen mit Fibroblasten-konditioniertem Medium (KM) für 15 Minuten, 6 Stunden und 24 Stunden stimuliert.

4.8.2 Herstellen von Zelllysaten

Zur Herstellung der Zelllysate wurde zunächst das Medium aus den 6-Well-Platten entfernt und die Platten auf Eis platziert. Anschließend wurde in jedes 6-Well Loch 80µl des RIPA-Lyse Puffers zugegeben. Die abgenommenen Medien wurden einzeln in Falconröhrchen bei 1420rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 20µl RIPA-Lyse Puffer resuspendiert und zurück in das entsprechende Well gegeben. Im Anschluss erfolgte bei -20°C eine einstündige Inkubation.

4.8.3 Proteinextraktion und Bestimmung der Proteinkonzentration

Nach dem Auftauen der Platten auf Eis wurden die Zellen mittels Zellschaber aus den Wells gelöst und in Reaktionsröhrchen überführt. Es erfolgte der Zellaufschluss mittels Ultraschall auf Eis für 10 x 1 Sekunde. Nach der 15-minütigen Zentrifugation bei 13000rpm bei 4°C wurde der entstandene Überstand entfernt und bei -20°C eingelagert. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben wurde das DC-Protein Assay Kit verwendet. Eingelagerte Proteinproben wurden auf Eis aufgetaut. Es erfolgten zwei Ansätze von jeweils 3µl des Proteinextraktes mit 12µl RIPA-LYSE Puffers in Reaktionsröhrchen. Je 5µl dieser Lösung wurde für vier technische Replikate auf eine 96-Well Platte aufgebracht. Die im Kit mitgelieferten Standardproteinlösung wurden in aufsteigender Verdünnung mit RIPA-Lyse Puffer (2mg/ml Protein, 1,5mg/ml, 1mg/ml, 0,5mg/ml, 0,25mg/ml, 0,125mg/ml) aufgebracht. Als Negativkontrolle fungierte RIPA-Lyse Puffer. Im Anschluss wurden 20µl der mitgelieferten Lösung S mit 1ml Reagenz A vermischt und anschließend 25 µl dieser Lösung in jedes vorbereitete Well gegeben. Nach der abschließenden Zugabe von 200µl Reagenz B und Schwenken der Platte erfolgte die Inkubation für 15 Minuten unter Tageslichtausschluss. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Extrakte erfolgte die photometrische Detektion der Absorptionswerte im Mikrotiterplatten-Photometer bei 700nm. Zur weiteren Vorbereitung des Western Blots wurden 25µl 4-fach konzentrierter Lämmli-Puffer mit der Proteinlösung und Ripa-Lyse Puffer so auf ein Endvolumen von 100µl aufgefüllt, das eine Endproteinkonzentration von 2µg/µl vorlag. Die Proteinverdünnung wurde dann bei 95°C für 5 Minuten im Thermomixer denaturiert und konnte anschließend bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

4.8.4 SDS Page

Während des Auftauens und Aufschütteln der Proteinverdünnung wurden die Gele vorbereitet. Dazu wurden die Gelkammer und das Tris-Glycin-Gel mit Laufpuffer gespült, der Gelkamm entfernt und auch die Geltaschen dreimal mit Laufpuffer gespült. Erst danach wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt. Die erste Geltasche wurde zur Größenbestimmung der Proteine mit 5 µl der Standards (Precision Plus Protein Dual Color) beschickt. Anschließend wurden die übrigen Taschen mit jeweils 20µl (bzw. 40µl bei großen Taschen) der Proben befüllt. Die Elektrophoresekammer wurde zu etwa einem Drittel mit Laufpuffer aufgefüllt. Danach erfolgte die Auftrennung der Proteine bei 120 Volt über 90 Minuten.

4.8.5 Western Blot

Nach durchlaufener Elektrophorese wurde das Gel aus der Kammer entnommen, die Plastikverschalung aufgebrochen und das Gel vorsichtig mit Blotting Puffer gespült. Vorbereitend wurden in einer Wanne Schwämme und Whatman-Paper mit mit 20-%iger Methanollösung versetztem Blotting-Puffer getränkt. Eine Transfer Membran wird zuerst in Methanol hydratisiert,

dann mit destilliertem Wasser gewaschen und schließlich in Blotting-Puffer gelegt. Zur Vorbereitung des Plots wurden drei eingeweichte Schwämme in der Plastikwanne gestapelt, darauf ein Whatman-Paper, das Gel und darauf die Transfermembran. Zum Schluss folgte wieder ein Whatman-Paper sowie erneut drei Schwämme. Der so entstandene Stapel wurde in ein Haltemodul (Xcell II Blot Modul) eingespannt und erneut in der Elektrophorese Kammer positioniert. Nach der Befüllung der Kammer mit Blotting Puffer wurde für 60 Minuten eine Spannung von 10 Volt angelegt und die Proteine auf die Membran übertragen.

4.8.6 Indirekter Antikörpernachweis

Nach dem Blot wurden die Membranen in Methanol hydratisiert und anschließend in TBS-T gewaschen. Es erfolgte die Blockung der Membran auf dem Schüttler in einer TBS-T Lösung mit 5% BSA und Albumin Fraktion V. Anschließend wurde die Membran in ein 50ml-Reaktionsgefäß überführt und mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C auf dem Rollenmixer inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran dreimal für je 10 Minuten in TBS-T auf dem Schüttler gewaschen. Anschließend wurde die Membran in einem neuen Reaktionsgefäß mit den Sekundärantikörpern im Dunklen über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach drei erneuten, jeweils 10-minütigen Waschungen der Membran mit TBS-T im Dunklen wurde die Membran kurz in Methanol überführt und schließlich auf einem Whatman-Paper für 15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Die Detektion des Fluoreszenzsignals erfolgte anschließend im Infrarot Scanner, wurde dann über die Image Studio lite® -Software visualisiert und zur Archivierung digital gespeichert. Die Membranen konnten anschließend bei 4°C gelagert werden.

4.9 Kristallviolett Viabilitäts Assay

Zum Nachweis der Zellviabilität der adhärenen Zellen wurde der Kristallviolettassay verwendet. Die Menge an Proteinen sowie DNA und damit auch mit der Menge an adhärenen Zellen korreliert hierbei mit der Farbstoffmenge gemessen durch Adsorption.

Zur Zellviabilitätsbestimmung unter der Behandlung erfolgte zunächst die Aussaat von jeweils 5.000 Fibroblasten oder 10.000 Tumorzellen in 100µl Medium pro Well auf 96-Well Platten. Anschließend wurden diese für 24 Stunden in Standardbedingungen kultiviert. Nach visueller Kontrolle der Zelldichte wurden die Zellüberstände entfernt, die Zellen einmalig mit PBS gewaschen und daraufhin die Behandlungslösungen aufgebracht. Nach entsprechender Behandlungsdauer von jeweils 24, 48 oder 96 Stunden wurden die Überstände entfernt und verworfen. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen um tote Zellen zu entfernen. Daraufhin erfolgte die Zugabe der Kristallviolettlösung (0,5% Kristallviolett in 20% Methanollösung). Nach 20-minütiger Inkubation auf einem Schüttler wurden die Wells bis zum Erreichen einer farbfreien Lösung mehrfach mit destilliertem Wasser gewaschen und

anschließend über Nacht bei Raumluft getrocknet. Zur Lösung des aufgenommenen Farbstoffes erfolgte die erneute Füllung der Wells mit je 200µl 96% Methanol. Nach 20 Minuten auf dem Schüttler erfolgte die Bestimmung Farbstoffkonzentration durch Adsorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 590nm (Referenz 700nm) im Mikrotiterplatten-Photometer. Als Leeraufnahme fungierten mit Methanol gefüllte, während der Behandlung zellfreie Wells. Zur Negativkontrolle wurden stets die höchsten Konzentrationen der jeweils verwendeten Lösungsmittel mit untersucht. Die hier gemessenen photometrischen Ergebnisse wurden als Kontrolle gleich 1 gesetzt. Mit den Messwerten aus den Behandlungsgruppen wurden Verhältnisse gebildet. Alle Versuche wurden mit je fünf technischen Replikaten und zwei biologischen Replikaten durchgeführt. Für die Viabilitätstestung wurden aufsteigende Dosen von Everolimus, Cyclosporin A und MPA in jeweils separaten 6-Well Platten verwendet. Die Messung erfolgte nach 24, 48 und 96 Stunden nach Beginn der Behandlung.

4.10 Behandlung der Ko-Kultur aus CCCs und TAFs mit Everolimus, MPA oder CsA im modifizierter Boydenchamber Assay für 30 h

In Analogie zu dem unter 4.6 beschriebenen Ko-Kultur Ansatz von CCC-Zellen und TAFs untersuchten wir in diesem Setting die Wirkung von Everolimus, Cyclosporine und Mycophenolsäure in ausgewählter Dosierung. Dazu wurden nach gleicher Vorbereitung bis zum Versuchsstart die entsprechenden Konzentrationen der Medikamente gelöst in FCS-freiem DMEM zu den Tumorzellen ins Insert sowie ins Well, zu den Fibroblasten, hinzugegeben. Als Untersuchungszeit wurde diesmal eine Inkubation von 30 Stunden gewählt, um der Zellzykluszeit der Tumorzellen näher zu kommen und so verzerrende Effekte durch übermäßige Proliferation zu minimieren. Gleichzeitig wurde auf jeder Platte parallel eine Lösungsmittelkontrolle der Medikamente (DMSO bzw. Methanol) mituntersucht. Das Ergebnis der Zellzählung dieser Inserts wurde im Weiteren als Kontrolle gleich 1 gesetzt. Die Quantifizierung der durch die Membran gewanderten Zellen erfolgte in Analogie zum oben beschriebenen Vorgehen. Alle Versuche wurden mit je 6 technischen Replikaten und in zwei biologischen Replikaten durchgeführt.

4.11 Behandlung mit Everolimus - Proteinbiochemische Methodik

4.11.1 Behandlung der CCCs mit Everolimus vor Stimulation mit hIL-6 oder FCS

In Analogie zu 4.8 wurden 3×10^5 CCC-Zellen pro Well in 6-Well Platten ausgesät und für 24 Stunden in FCS-haltigem DMEM bei den üblichen Kulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mehrfach mit PBS gewaschen und das Medium gegen FCS-freies DMEM mit Everolimus, beziehungsweise 0,1% DMSO in DMEM als Lösungsmittelkontrolle, ausgetauscht. Dabei wurde Everolimus in einer Konzentration von 10nmol oder 1µmol verwendet. Nach 24 Stunden Behandlungszeit erfolgte eine weitere Waschung mit PBS. Daraufhin wurden die Zellen entweder mit

FCS haltigem DMEM oder 100ng/ml hIL-6 in DMEM für 15 Minuten stimuliert. Die anschließende Messung erfolgte nach den unter 4.8.2 - 4.8.6 beschriebenen Schritten inklusive der Herstellung der Zelllysate, Proteinextraktion und Bestimmung, Auftrennung im SDS-Page, Western Blot und Immunnachweis.

4.11.2 Behandlung der TFK-1 mit Everolimus vor der Stimulation mit KM

Nach der Aussaat von 3×10^5 TFK-1 Zellen pro Well in 6-Well Platten wurden diese für 24 Stunden in FCS- haltigem DMEM inkubiert und anschließend 24 Stunden mit $1 \mu\text{mol}$ Everolimus behandelt. In Überschneidung mit einer parallel laufenden Versuchsreihe im gleichen Versuchsansatz fand parallel auch die Analyse der Behandlung mit $10 \mu\text{M}$ Sorafenib statt. Als Lösungsmittelkontrolle erfolgte die Behandlung mit 0,1% DMSO in DMEM. Danach folgte die Waschung mit PBS sowie daraufhin die Zugabe von TAF-konditioniertem Medium. Nach 15 Minuten wurde die Stimulation gestoppt. Das weitere Vorgehen erfolgte wie unter 4.8 beschrieben.

4.11.3 Behandlung der TAFs mit Everolimus und Sorafenib vor der Gewinnung von konditioniertem Medium

3×10^5 Tumorassoziierte Fibroblasten pro Well wurden in 6-Well Platten ausgesät und für 24 Stunden in FCS-haltigem DMEM inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt, mit PBS gespült und zur Behandlung FCS-freies DMEM mit entweder $1 \mu\text{mol}$ Everolimus oder $10 \mu\text{mol}$ Sorafenib hinzugefügt. Als Lösungsmittelkontrolle wurde FCS-freies DMEM mit einer Konzentration von 0,1% DMSO verwendet. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgenommen und in Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden das Medium bei 1500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Die obersten zwei Drittel der Flüssigkeitssäule wurden ohne das Zellpellet zu resuspendieren vorsichtig abgenommen und zur weiteren Verwendung gelagert. Die TFK-1 Zellen wurden wie unter 3.9.1 beschrieben ausgesät. Nach 24 stündiger Inkubation in FCS-freiem DMEM erfolgte die Zugabe des behandelten, konditionierten Mediums. Nach 15-minütiger Stimulation wurde wie unter 4.8 weiter verfahren.

4.12 Statistische Auswertung

Die gewonnenen Daten wurden mittels GraphPad Prism 5 Software für Microsoft von Graphpad Software, Inc. analysiert. Nach Erhebung der Messdaten wurden diese in das Programm übertragen. Es erfolgte die Berechnung der Mittelwerte entsprechend der Messdaten sowie der jeweiligen Standardabweichung (SD) von n. Wobei n hierbei die Anzahl der unabhängigen Messpunkte darstellt. Signifikanzen wurden mittels ungepaartem, zweiseitigem t-test ermittelt. Dabei wurde ein p-Wert von $<0,05$ als statistisch signifikant angenommen.

5 Ergebnisse

5.1 Immunzytochemische Charakterisierung der TAFs

Um die aus Primärtumoren oder Metastasen gewonnen tumorassoziierten Fibroblasten als solche zu identifizieren erfolgte eine morphologische Beurteilung sowie die immunzytochemische Färbung von Panzytokeratin, Vimentin und 'α-smooth muscle actin' (αSMA). Siehe hierzu Abbildung 2. Es fielen eindeutig teils trapezoide, teils spindelig ausgezogene Zellkörper mit zentralen Zellkernen auf. Sowohl die positive Färbung für Vimentin als auch die negative Panzytokeratin Färbung sprechen für einen mesenchymalen Ursprung der Zellen. Die Zellentität konnte damit als Fibroblasten bestätigt werden. Der weitere stark positive α-SMA Befund spricht für eine myofibroblastische Differenzierung.

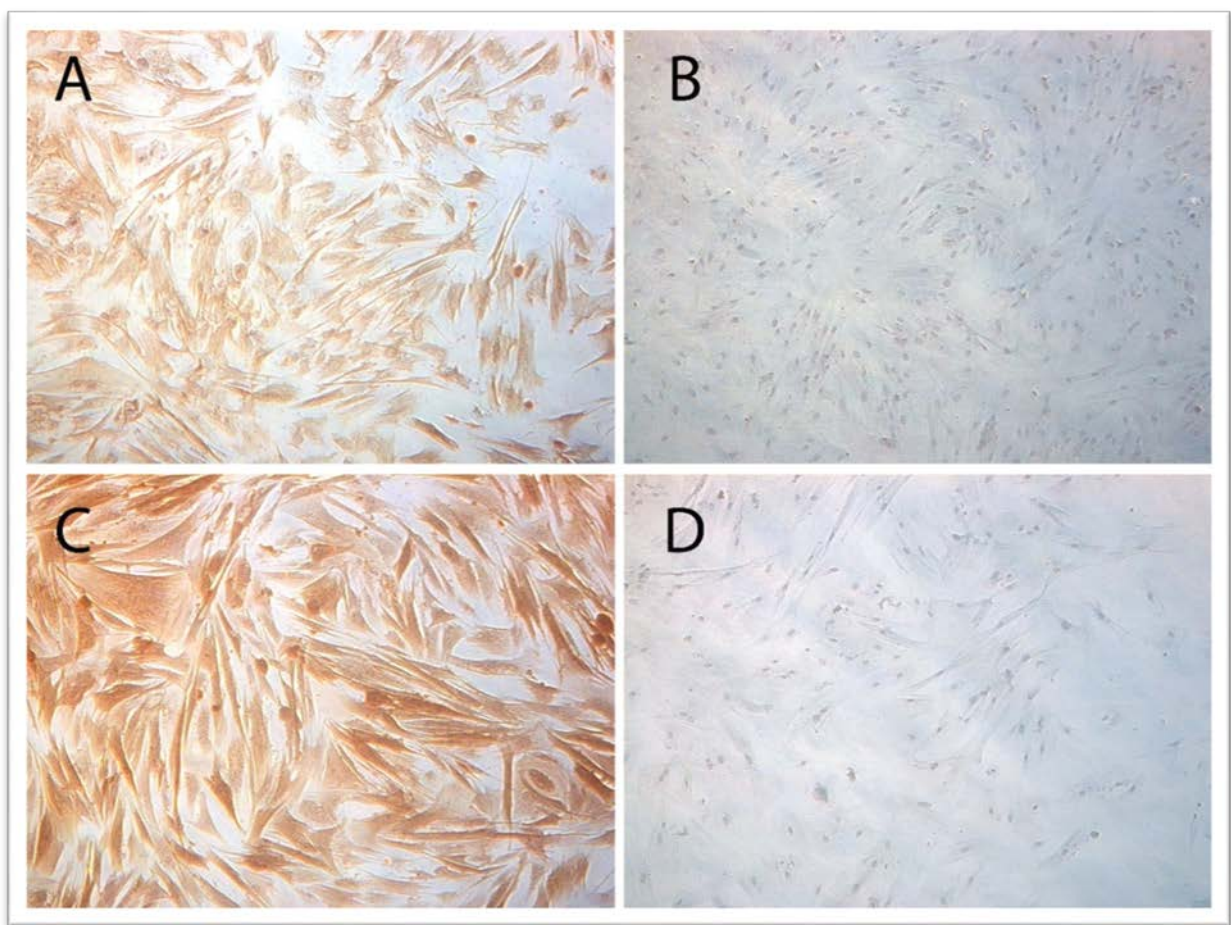


Abb.2 Immunzytochemie der TAFs. Objektträgerkulturen von TAFs in 40-facher, lichtmikroskopischer Vergrößerung. Färbung nach Vimentin (A), Panzytokeratin (B) und αSMA (C). Braunfärbung zeigt Positivität. D zeigt Negativkontrolle.

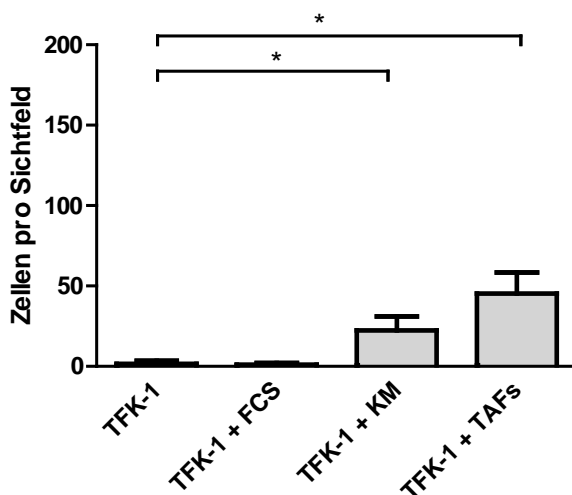
5.2 Stimulation der CCCs durch TAFs im modifizierten Boydenchamber Ansatz

Zur weiteren Untersuchung der gewonnen TAFs sollte deren stimulierender Einfluss auf CCC-Zellen bestätigt werden. Dazu erfolgte ein modifizierter Versuchsansatz in der Boydenchamber wo TFK-1

Zellen oder HuCCT-1 Zellen unter den Einfluss von FCS, konditioniertem Medium (KM) oder in Ko-Kultur mit TAFs gebracht wurden. Bei der TFK-1 Population wurde nach 48 Stunden Inkubation sowohl eine signifikante Zunahme der Zellzahl unter dem Einfluss von KM als auch in direkter Ko-Kultur im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle festgestellt. Durch FCS wurde keine Zunahme erreicht. Dabei fiel auf, dass die TFK-1 Zellen in diesem Versuchsaufbau in Abwesenheit eines Stimulus keinerlei Migrationsverhalten zeigten. Siehe hierzu Abbildung 3A.

Im Falle der HuCCT-1 Zellen zeigte sich auch in Abwesenheit eines Stimulus bereits eine kräftige Zunahme der gemessenen Zellzahl. Eine Stimulation durch FCS konnte diese signifikant steigern. Eine etwas geringe Stimulation zeigte sich auch in direkter Ko-Kultur mit TAFs. Mit dem alleinigen Einsatz von KM konnte hingegen keine Zunahme der Zellzahl gegenüber der unstimulierten Kontrolle erreicht werden (Abbildung 3B).

A TFK-1 Stimulation



B HuCCT-1 Stimulation

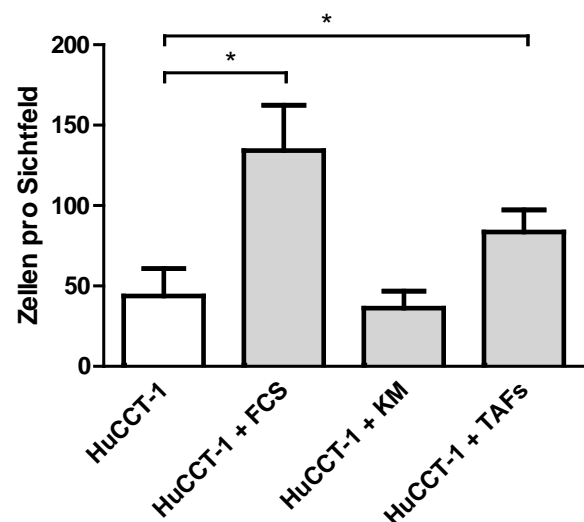


Abb.3 CCC Stimulation. Zählung der cholangiozellulären Tumorzellen (TFK-1/HuCCT-1) nach Durchwanderung einer Membran mit 8µm Poren unter Stimulation mit FCS, konditioniertes Medium (KM) oder in Ko-Kultur mit Tumorassoziierten Fibroblasten (TAFs). A TFK-1 Zellen. B HuCCT-1 Zellen. MW+SD, Signifikanzniveau *= $p < 0,05$ gegen unstimulierte Kontrolle

5.3 Zytokinexpressionsmuster der TAFs

Zur weiteren Charakterisierung der TAFs wurde das Zytokinexpressionsmuster bestimmt. Hierzu wurde FCS-freies, von TAF konditioniertes DMEM im Protome Profiler Array Human Cytokine Panel A untersucht. Exemplarisch zeigt Abbildung 4 eine entsprechende, mit konditioniertem Medium

inkubierte Membran. Es konnte hier reproduzierbar die Expression unterschiedlicher Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren in verschiedenen Konzentrationen nachgewiesen werden. Darunter unter anderem CD40-Ligand, G-CSF (Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor), GR0 α (CXCL1), IL-1ra (Interleukin-1 Rezeptor Antagonist), IL-6 (Interleukin 6), IL-8 (Interleukin 8, CXCL8), IL-13 (Interleukin 13), IL-16 (Interleukin 16, LCF), IL-17E (Interleukin 17-E, Interleukin 25), MCP-1 (Monozyten Chemotaxis Protein 1, CCL2), MIF (Makropagen Migration inhibierender Faktor, GIF, DER6) und Serpin E1 (PAI-1 PlasminogenAktivatorinhibitor Typ 1).

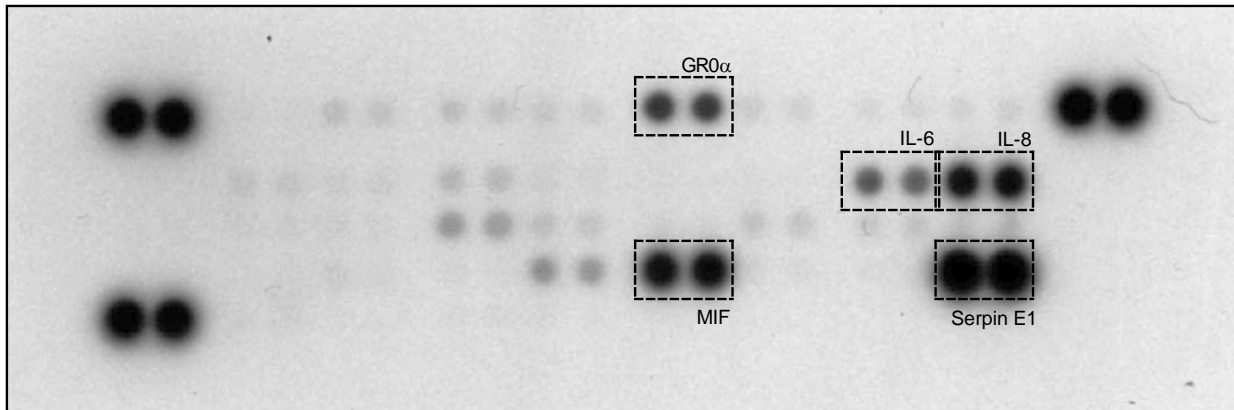


Abb.4 Zytokinexpression der TAFs. Scan einer mit konditioniertem Medium inkubierten Zytokinarray Membran. Hervorgehoben sind die mengenmäßig am stärksten vertretenen Zytokine GR0 α (CXCL1), IL-6, IL-8, MIF und Serpin E1. Positivkontrollen in oberen beiden und unterer linken Ecke. Negativkontrolle unten rechts.

5.4 Stimulation der CCCs durch KM - Einfluss auf Akt, STAT3 und Erk

Um die Interaktion zwischen CCC-Zellen und den isolierten TAFs weiter zu beschreiben, wurden Proteinanalysen in Form von Western Blots durchgeführt. Hierzu wurde der Phosphorylierungsstatus von Akt, Erk und STAT3 in TFK-1 und HuCCT-1 Zellen unter Stimulation mit FCS oder KM untersucht.

Bei der TFK-1 Zelllinie kann man ohne Stimuli nahezu keine Phosphorylierung von Akt oder Erk beobachten. Bei STAT3 verzeichnet man bereits eine leichte, basale Phosphorylierung. Die Phosphorylierung aller drei untersuchten Proteine kann durch die 15-minütige Stimulation mit KM deutlich verstärkt werden. Dieser Effekt nimmt über die Zeit ab und ist bei STAT3 nach 6 Stunden, bei Akt und Erk nach 24 Stunden nicht mehr nachweisbar. Die alternative Zugabe von FCS erhöht die Phosphorylierung von Akt ähnlich stark wie KM. Die Phosphorylierung von Erk wird dadurch gering gesteigert. Dieser Effekt hält bei Akt auch noch nach 24 Stunden an und lässt bei Erk und STAT3 bereits nach 6 Stunden deutlich nach.

Im Falle der HuCCT-1 Zelllinie zeigt sich bereits ohne Stimulation eine deutliche Phosphorylierung von Akt und Erk, die auch noch nach 24 Stunden unverändert erkennbar ist. Eine Stimulation durch FCS oder KM erreicht nach 15 Minuten eine leichte Zunahme der Phosphorylierung von Erk. Bei Akt kann kein sicherer Unterschied ausgemacht werden. Bei STAT3 ist die endogene Phosphorylierung deutlich geringer ausgeprägt. Eine Stimulation durch KM lässt sich bereits nach 15 Minuten nachweisen. Dieser Effekt hält auch über 24 Stunden an. Die Stimulation mit FCS zeigt erst in der 6 Stunden Messung einen Effekt durch verstärkte Phosphorylierung. Diese hält noch nach 24 Stunden an.

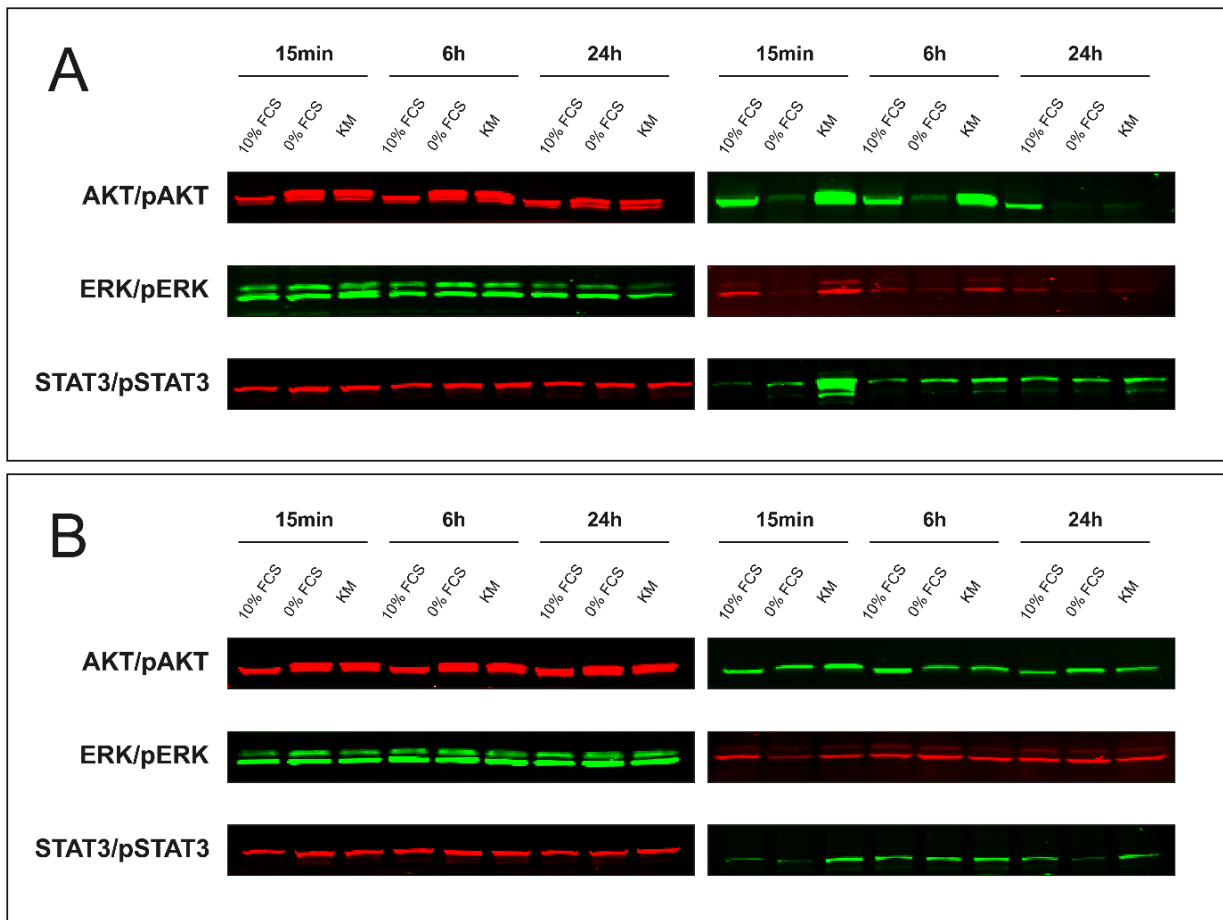


Abb.5 Western Blot Analyse nach Stimulation der CCCs mit FCS oder TAF-konditioniertem Medium (KM). Nach 24 stündiger Hungerphase wurden die CCCs entweder mit FCS haltigem DMEM oder TAF-konditioniertem Medium für jeweils entweder 15 Minuten, 6 Stunden oder 24 Stunden stimuliert. Repräsentativ ist ein Blot aus drei gezeigt. Links im Bild sind die Banden der unphosphorylierten Proteine abgebildet, rechts die phosphorylierten. A zeigt die Tumorzelllinie TFK-1. Es fällt eine kräftige Zunahme der Phosphorylierung sowohl von Akt, Erk und STAT3 auf. B zeigt die Tumorzelllinie HuCCT-1. Im Gegensatz zu TFK-1 fällt hier die Zunahme der Phosphorylierung deutlich geringer aus. Akt und Erk zeigen hier bereits eine endogene Aktivierung.

5.5 Einfluss von Cyclosporin A, MPA und Everolimus auf die Zellviabilität der CCCs und TAFs

Anschließend sollte der Einfluss von etablierten Immunsuppressiva in unterschiedlichen Konzentrationen sowie über verschiedene Behandlungsdauern auf die Zellviabilität der TFK-1, HuCCT-1 sowie der TAFs Zelllinien in Monokultur untersucht werden. Zur Dosisfindung wurde sich dabei an den etablierten Serumspiegeln zur Immunsuppression der jeweiligen Medikamente orientiert. Darüber hinaus sollten Medikamentendosierungen für die weitere Versuchsplanung gefunden werden, die einen möglichst geringen Einfluss auf die Zellviabilität der TAFs haben. Untersucht wurden dazu Cyclosporin A in Konzentrationen zwischen 31,25nM und 1µM, Mycophenolsäure in Konzentrationen zwischen 0,5µM und 50µM sowie Konzentrationen von Everolimus zwischen 0,5nM und 5µM.

Cyclosporin A (CsA)

Nach 24 Stunden Behandlung mit CsA konnte in keiner der behandelten Zelllinien ein Effekt gemessen werden. Nach 48 Stunden Behandlungszeit zeigte sich in einer Konzentration von 1 µM eine minimale, aber signifikante Reduktion der Zellviabilität sowohl bei TFK-1 (6 % gegenüber Lösungsmittelkontrolle) als auch HuCCT-1 (1,5 %). Außerdem konnte bei TFK-1 auch unter der niedrigeren Konzentration mit 500nM über 96 Stunden eine signifikante Reduktion erreicht werden. Diese fiel in ihrem Ausmaß aber ähnlich gering aus (8 % gegenüber Kontrolle).

Auf die TAFs zeigte CsA in keiner der getesteten Konzentrationen oder Behandlungsdauern einen signifikanten Effekt.

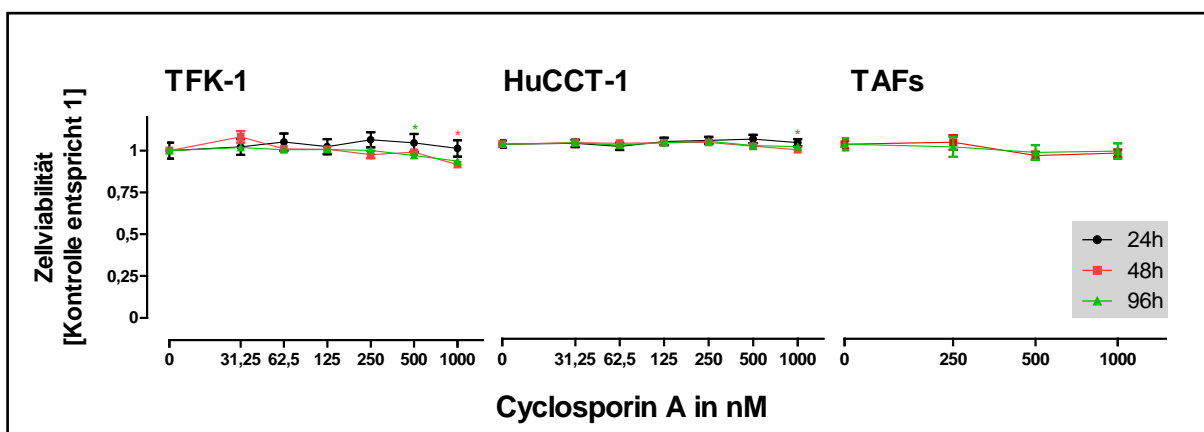


Abb.6.1 Kristallviolett-Viabilitäts Assay für TFK-1, HuCCT-1 und TAFs nach 24, 48 oder 96 Stunden Behandlung mit Cyclosporin A. Messung der Extinktionswerte bei 590nm und Darstellung im Verhältnis zur Lösungsmittelkontrolle. Logarithmische Darstellung der eingesetzten Cyclosporin A Konzentrationen in nM. * markiert die niedrigste Dosis bei der nach der jeweiligen Behandlungsdauer eine signifikante ($p < 0.05$) Änderung zur Lösungsmittelkontrolle gemessen wurde.

Mycophenolsäure (MPA)

Unter der Behandlung mit MPA fiel sowohl bei der TFK-1 als auch der HuCCT-1 Zelllinie ein deutlicher, stark konzentrations- und zeitabhängiger Effekt auf die Zellviabilität auf. Eine signifikante Reduktion der Zellviabilität konnte bei TFK-1 nach 24 Stunden bei einer Konzentration von 1 μM beobachtet werden. Bei den übrigen Behandlungsdauern von 48 oder 96 Stunden wurde eine signifikante Reduktion schon unter der niedrigsten, getesteten MPA Konzentration von 0,5 μM erreicht. Der stärkste Effekt wurde unter der maximalen Konzentration von 50 μM MPA über 96 Stunden Behandlungszeit gemessen. Hier fiel die Zellviabilität auf 18% ab.

Ähnlich verhielten sich die HuCCT-1 Zellen. Auch hier konnte zu allen Behandlungszeiträumen bereits unter der niedrigsten getesteten Konzentration eine signifikante Reduktion der Zellviabilität erreicht werden. Die stärkste Reduktion der Zellviabilität zeigte sich hier bei der 50 μM Konzentration nach 96 Stunden Behandlungszeit (Abfall bis auf 33 % gegenüber der Kontrolle).

Bei der Behandlung der TAFs fiel ein deutlich geringer Effekt auf die Zellviabilität auf. Unter der Konzentration von 10 μM zeigte sich ein Abfall um 11 % nach 48 Stunden beziehungsweise 14 % nach 96 Stunden. Unter der niedrigen getesteten Konzentration von 0,1 μM ließ sich keine Reduktion der Zellviabilität unter MPA messen.

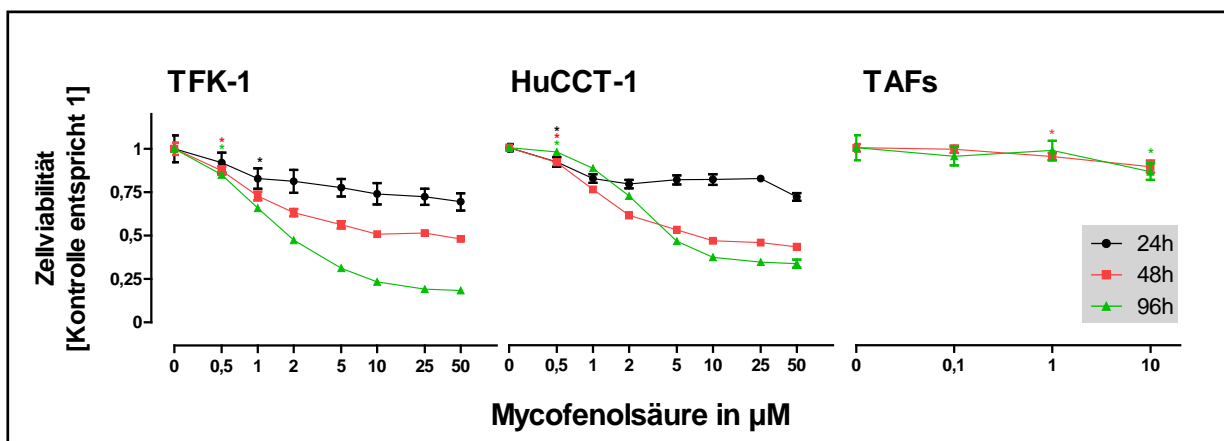


Abb.6.2 Kristallviolett-Viabilitäts Assay für TFK-1, HuCCT-1 und TAFs nach 24, 48 oder 96 Stunden Behandlung mit Mycophenolsäure. Messung der Extinktionswerte bei 590nm und Darstellung im Verhältnis zur Lösungsmittelkontrolle. Logarithmische Darstellung der eingesetzten Mycophenolsäure Konzentrationen in μM . * markiert die niedrigste Dosis bei der nach der jeweiligen Behandlungsdauer eine signifikante ($p < 0.05$) Änderung zur Lösungsmittelkontrolle gemessen wurde.

Everolimus

Unter der Behandlung mit Everolimus zeigte sich eine geringere zeit- und dosisabhängige Reduktion der Zellviabilität als mit der Behandlung mit MPA. Dieser Effekt war jedoch selbst in der niedrigsten getesteten Konzentration von 0,5 nM in allen drei Zelllinien signifikant messbar. Bei der Behandlung der CCC-Zelllinien fiel auf, dass der generelle Effekt auf die Zellviabilität über 96 Stunden im Vergleich zu den anderen Behandlungsdauern deutlich nachließ. Jedoch zeigte sich bei dieser langen Behandlungsdauer vor allem bei der TFK-1 Zelllinie ein größerer konzentrationsabhängiger Effekt. Unter niedrigen Dosen fiel kaum eine Reduktion der Viabilität auf, in den höchsten getesteten Dosierungen konnte jedoch ein ähnlicher Effekt wie nach 48 Stunden erreicht werden. Die stärkste Reduktion auf 56 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle wurde bei TFK-1 nach 96 Stunden unter 5µM gemessen. Der Einfluss auf HuCCT-1 fiel insgesamt geringer aus. Der dosisabhängige Effekt war hier deutlich geringer ausgeprägt. Die stärkste Reduktion war hier nach 48 Stunden auf 75 % zu verzeichnen.

Die TAFs zeigten eine nahezu gleichbleibende Beeinflussung sowohl über die Zeit als auch konzentrationsabhängig. Hier konnte schon bei einer Dosierung von 0,5nM eine signifikante Viabilitätsreduktion auf 82 % beobachtet werden. Dieser Effekt änderte sich auch unter höher Everolimuskonzentration oder längerer Behandlungsdauer nicht signifikant.

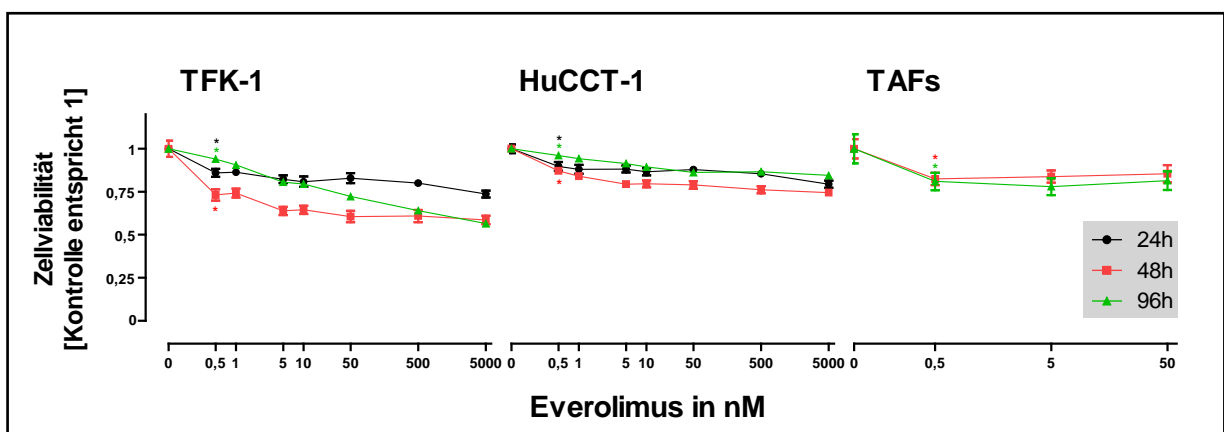
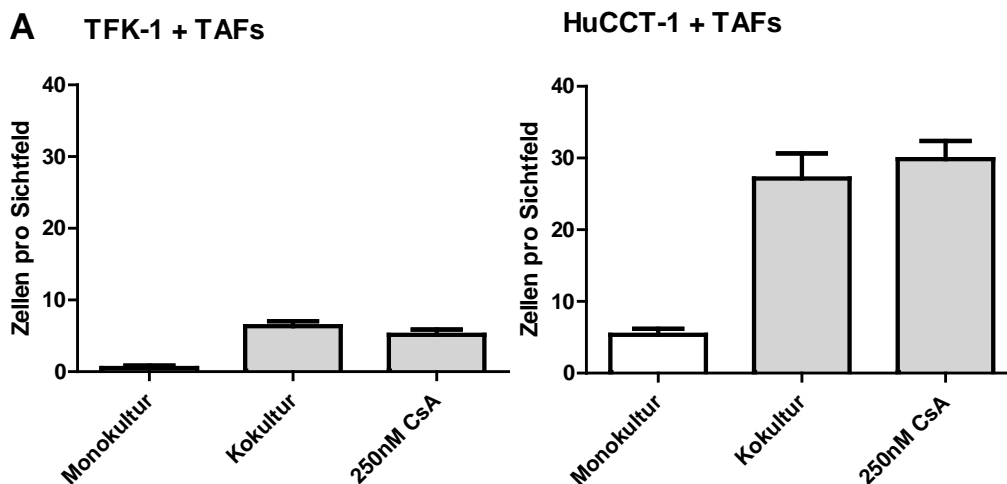


Abb.6.3 Kristallviolett-Viabilitäts Assay für TFK-1, HuCCT-1 und TAFs nach 24, 48 oder 96 Stunden Behandlung mit Everolimus. Messung der Extinktionswerte bei 590nm und Darstellung im Verhältnis zur Lösungsmittelkontrolle. Logarithmische Darstellung der eingesetzten Everolimus Konzentrationen in nM. * markiert die niedrigste Dosis bei der nach der jeweiligen Behandlungsdauer eine signifikante ($p < 0.05$) Änderung zur Lösungsmittelkontrolle gemessen wurde.

5.6 Einfluss von Cyclosporin, MPA und Everolimus auf die Ko-Kultur aus CCCs und TAFs

Im folgenden Versuchsansatz sollte der Effekt der ausgewählten Immunsuppressiva im CCC und TAF Ko-Kultur Setting weiter untersucht werden. Es wurden möglichst hohe Medikamentenkonzentrationen gewählt, die jedoch einen möglichst niedrigen Effekt auf die Zellviabilität, besonders der TAFs, zeigten und noch annähernd im klinisch-therapeutischen Bereich liegen. Getestet wurden Cyclosporin A (CsA) in einer Konzentration von 250nM, Mycophenolsäure (MPA) in 0,1µM und eine 1nM Everolimus (E.) Konzentration. Abbildung 7 stellt die Messungen der migrierten CCC-Zellen im Boydenchamber Ansatz unter Stimulation durch TAFs und Behandlung mit Immunsuppressiva dar. Mit den ausgewählten Konzentrationen von CsA konnte kein Einfluss auf die TAF-stimulierte Zunahme der migrierten Zellen festgestellt werden. Auch nach der Behandlung mit 0,1mM MPA konnte keine signifikante Änderung der Zellzahl gemessen werden. Die Everolimus Behandlung zeigte eine signifikante Reduktion der Zellzahl um 42 % bei TFK-1 und 28 % bei HuCCT-1 als Ausdruck der geminderten Migration im Ko-Kultur Ansatz. Das Niveau der unstimulierten Monokulturkontrolle konnte damit bei beiden Zelllinien nicht erreicht werden.



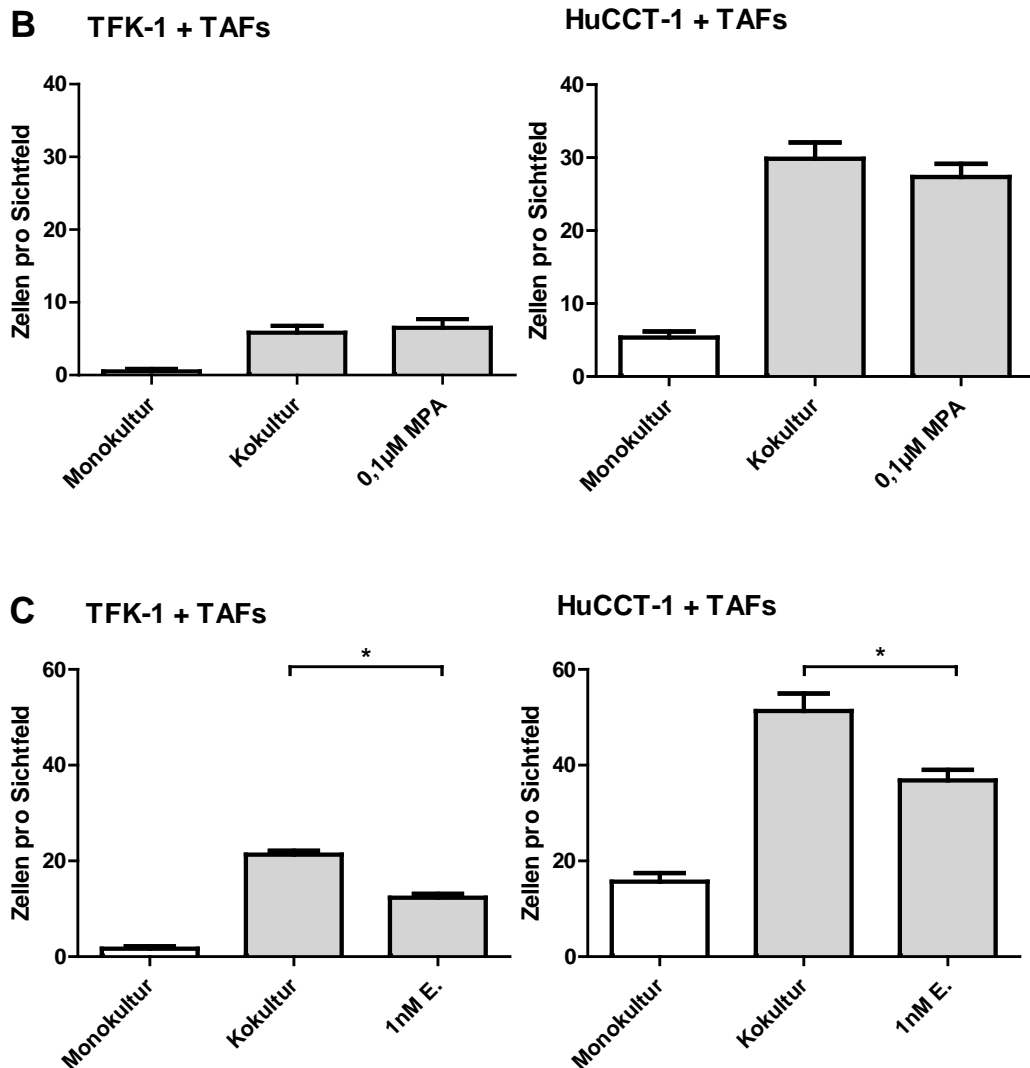


Abb.7 Migration der cholangiozellulären Tumorzellen nach 30 Stunden in Monokultur, Ko-Kultur mit TAFs sowie in Ko-Kultur mit TAFs unter Behandlung mit Cyclosporin A (A), Mycophenolsäure (B) oder Everolimus (C). Messung der migrierten CCC-Zellen durch Zählung der Zellen an der Unterseite der Transmembran-Inserts. Darstellung der Mittelwerte sowie Standardabweichung der Zellen pro Sichtfeld. Gezählt wurden je drei zufällig bestimmte Sichtfelder im Doppelansatz unter 40-facher Vergrößerung. * symbolisiert signifikante Änderung der Zellzahl pro Sichtfeld (*= $p < 0.05$) unter Behandlung.

5.7 Behandlung der CCCs mit Everolimus vor Stimulation mit FCS und hIL-6

Anschließend sollte der Einfluss von Everolimus auf die bereits identifizierten Signalwege weiter untersucht werden. Als Stimulanz wurden als Analogon zu TAF-konditioniertem Medium FCS sowie hIL-6 verwendet. Eingesetzt wurden Everolimus Konzentrationen von 10nmol/l und 1µmol/l. Unter dem Einsatz von FCS konnte, wie im Vorversuch gezeigt, eine kräftigere Stimulation der

Phosphorylierung von Akt und Erk erreicht werden. STAT3 wurde nicht phosphoryliert. Im Falle der HuCCT-1 Zellen konnte auch die Stimulation mit hIL-6 eine Phosphorylierung von Akt und Erk erreichen. Bei TFK-1 ließen sich diese Proteine durch hIL-6 nicht stimulieren. Die Behandlung mit Everolimus im Vorfeld zeigte auf das geänderte Phosphorylierungsmuster in beiden Zelllinien keinen sichtbaren Effekt. Unter der Stimulation mit hIL-6 ließ sich jedoch in beiden Zelllinien eine leichte Phosphorylierung von STAT3 erzielen. Unter der höheren Everolimuskonzentration von 1µmol/l konnte diese sowohl bei TFK-1 als auch bei HuCCT-1 reduziert werden.

Nebenbei fällt auf, dass die Behandlung mit Everolimus selbst in beiden Zelllinien zu einer Phosphorylierung von Akt geführt hat.

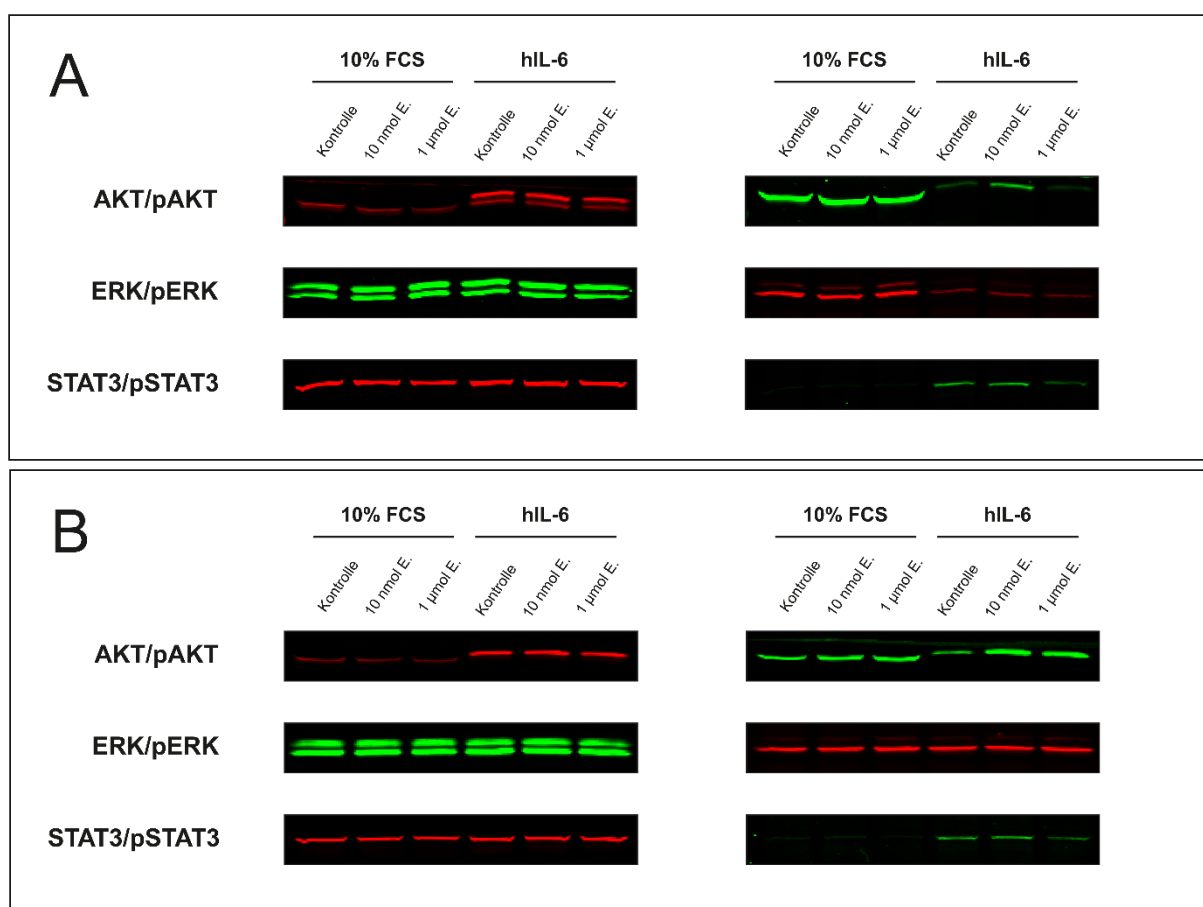


Abb.8 Western Blot Analyse nach 24-stündiger Behandlung der CCCs mit Everolimus mit anschließender Stimulation durch FCS oder hIL-6. Nach 24 stündiger Behandlungsphase mit unterschiedlichen Dosierungen Everolimus wurden die CCCs anschließend entweder mit FCS haltigem DMEM oder hIL-6 in DMEM für jeweils 15 Minuten stimuliert. Repräsentativ ist ein Blot aus zwei gezeigt. Links im Bild sind die Banden der unphosphorylierten Proteine abgebildet, rechts die phosphorylierten. A zeigt die Tumorzelllinie TFK-1, B die Zelllinie HuCCT-1. Unter FCS-Stimulation zeigt Everolimus auf beide Zelllinien keinen Effekt. In einer hohen Dosierung wird die Reduktion der Phosphorylierung von STAT3 unter hIL-6 Stimulation in beiden Tumorzelllinien erreicht.

5.8 Behandlung der TFK-1 mit Everolimus vor Stimulation mit KM

Im Anschluss sollte der Einfluss von 1µM Everolimus auf die CCC-Stimulation mit TAF-konditioniertem Medium untersucht werden. Analysiert wurden im Folgenden nur Zellen der TFK-1 Zellreihe, da diese im Gegensatz zu HuCCT-1 unter Hungerbedingungen eine kaum ausgeprägte endogene Phosphorylierung von Akt, Erk und STAT3 aufweisen.

Im Rahmen einer parallel laufenden Versuchsreihe der Arbeitsgruppe fand im gleichen Ansatz auch die Untersuchung des Einflusses von 10µM Sorafenib statt. Diese wird ebenfalls in Abbildung 9 dargestellt.

Im Gegensatz zu FCS und hIL-6 führt eine Stimulation mit KM in der TFK-1 Zelllinie zu einer verstärkten Phosphorylierung sowohl von Akt und Erk als auch in STAT3. Die vorherige Behandlung mit 1µM Everolimus oder 10µM Sorafenib änderte dabei nichts an dem nachfolgenden Phosphorylierungsmuster.

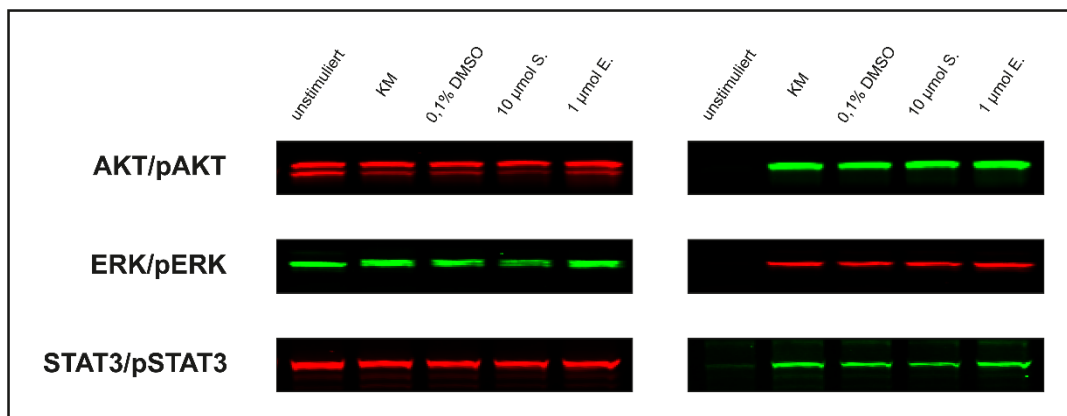


Abb.9 Western Blot Analyse nach 24-stündiger Behandlung der TFK-1 Zelllinie mit anschließender Stimulation durch KM. Nach 24-stündiger Behandlungsphase mit Sorafenib (S.) bzw. Everolimus (E.) wurden die TFK-1 Zellen anschließend mit TAF-konditioniertem DMEM (KM) für 15 Minuten stimuliert. Der Versuch wurde nicht wiederholt. Links im Bild sind die Banden der unphosphorylierten Proteine abgebildet, rechts die phosphorylierten. Unter den untersuchten Bedingungen zeichnet sich kein Effekt durch die Behandlung ab.

5.9 Behandlung der TFK-1 mit KM von mit Everolimus vorbehandelten TAFs

In Analogie zum vorherigem wurde in diesem Versuchsaufbau die TFK-1 Zelllinie neben der Stimulation mit regulärem TAF-konditioniertem Medium auch mit dem konditioniertem Medium von vorbehandelten TAFs inkubiert. Dazu wurde die TAFs für 24 Stunden entweder mit 1µM Everolimus (eKM) oder 10 µM Sorafenib (sKM) behandelt und das so konditionierte Medium anschließend wiederum auf die Tumorzellen aufgebracht.

Die kräftige Zunahme der Phosphorylierung der ausgewählten Proteine durch die 15-minütige Stimulation mit KM lässt sich auch hier wie schon in den vorherigen Versuchen reproduzieren. In der Analyse dieses Phosphorylierungsmusters nach der Stimulation mit eKM oder sKM von vorbehandelten TAFs zeigen sich in diesem Versuchsansatz keine Änderungen.

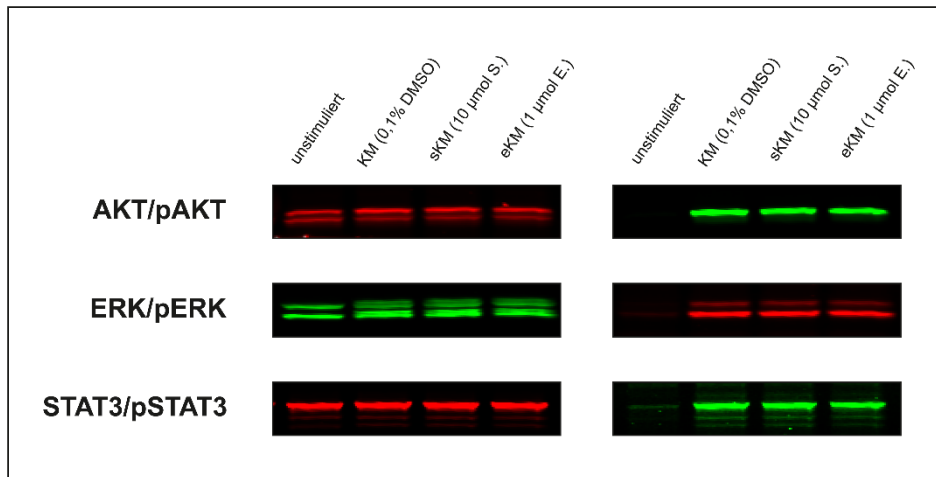


Abb.9 Western Blot Analyse nach 24-stündiger Behandlung der TAFs mit anschließender Stimulation der TFK-1 durch KM. Nach 24-stündiger Behandlungsphase der TAFs mit Sorafenib (S.) bzw. Everolimus (E.) wurde anschließend das so entstandene, konditionierte Medium (sKM, eKM) gewonnen und damit TFK-1 Zellen für 15 Minuten stimuliert. Der Versuch wurde nicht wiederholt. Links im Bild sind die Banden der unphosphorylierten Proteine abgebildet, rechts die phosphorylierten. Unter den untersuchten Bedingungen zeichnet sich kein Effekt durch die Behandlung ab.

6 Diskussion

In dieser Arbeit sollte der Einfluss immunsuppressiver Therapieansätze mit Cyclosporin A (CsA), Mycophenolsäure (MPA) und Everolimus auf die Interaktion von cholangiozellulären Tumorzellen und tumorassoziierten Fibroblasten untersucht werden. Die wesentlichen Aussagen die sich dabei aus dieser Arbeit ergaben sind:

1. Primäre, aus humanen Exzidaten gewonnene, α -SMA-positive Fibroblasten stimulieren signifikant das Wachstumsverhalten und die Invasion von CCC-Zellen.
2. Diese tumorassoziierten Fibroblasten produzieren eine Reihe löslicher Mediatoren (GRO α , IL-6, IL-8, MIF, Serpin E1). Es ist zu vermuten das diese Mediatoren den tumorprogressiven Effekt vermitteln.
3. Die Inkubation von CCC-Zellen mit durch TAFs konditioniertem Medium führt zur Phosphorylierung von Akt, Erk und STAT3 in TFK-1 Zellen. In HuCCT-1 Zellen führt dieses konditionierte Medium zu einer Verstärkung der bereits endogen vorhandenen Phosphorylierung.
4. Unter der Behandlung der CCC-Zellen mit CsA kommt es zu fast keiner Änderung der Zellviabilität. Die Behandlung mit MPA dagegen zeigt einen starken, zeit- und dosisabhängigen Effekt auf die Zellviabilität. Dabei ist der größte Effekt nach 96 Stunden unter einer maximalen Dosierung von 50 μ M zu beobachten. Es konnte ein Abfall der Zellviabilität auf 18 % im Falle der TFK-1 Zellen und auf 33 % im Falle von HuCCT-1 Zellen erreicht werden. TAFs werden durch diese Behandlung kaum beeinträchtigt. Everolimus zeigt einen geringeren zeit- und dosisabhängigen Effekt. Bereits unter der niedrigsten Dosierung von 0,5nM kann eine signifikante Reduktion der Zellviabilität gemessen werden. Größte Effekte waren hier nach 48 Stunden unter einer Dosis von 5 μ M mit einer Reduktion auf 56 % bei TFK-1 und 74 % bei HuCCT-1 gegenüber der unbehandelten Kontrolle zu beobachten. Eine Behandlung über 96 Stunden zeigt einen geringen Effekt.
5. In der getesteten Dosierung zeigen MPA und CsA keinen Effekt auf die, durch TAFs vermittelte, Stimulation der Invasion von CCC-Zellen in der Ko-Kultur. Die Behandlung mit Everolimus führt zu einer Reduktion der Invasion unter Ko-Kulturbedingungen.
6. Durch die Behandlung mit Everolimus kann eine durch hIL-6 ausgelöste Stimulation von STAT3 in CCC-Zellen reduziert werden.
7. Everolimus zeigt in der getesteten Dosierung keinen Einfluss auf die durch TAF-konditioniertes Medium vermittelte Phosphorylierung von Akt, Erk oder STAT3 in TFK-1 Zellen.
8. Die Behandlung der TAFs mit Everolimus in der ausgewählten Dosierung zeigt keinen Effekt auf die durch TAF-konditioniertes Medium bedingte Phosphorylierung von Akt, Erk oder STAT3 in TFK-1 Zellen.

6.1 Die Bedeutung α -SMA positiver, tumorassoziierter Fibroblasten beim cholangiozellulären Karzinom

Bereits im Vorfeld dieser Arbeit war der progressive Einfluss eines entzündlichen Tumorstromas auf Tumorwachstum und Metastasierung weitreichend akzeptiert (O'Hayre et al., 2008; Sansone & Bromberg, 2011). Für das intrahepatische CCC konnte bereits in früheren Studien ein Zusammenhang zwischen der Ausprägung eines desmoplastischen Stromas und Überlebensraten der Patienten gezeigt werden (Kajiyama et al., 1999). Dabei fiel auf, dass Patienten mit einem höheren Anteil an Kollagenexpression im Stroma kürzere Überlebenszeiten aufwiesen. So können Extrazellulärkomponenten, welche in der Leber von Fibroblasten und hepatischen Sternzellen und im Tumorgewebe von tumorassozierten Fibroblasten (TAFs) produziert werden, die Tumorprogression von CCCs beschleunigen (Okabe et al., 2009). Es wird postuliert, dass die Änderung der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix mit der Entwicklung hin zu einem desmoplastischen Stroma nicht nur Reaktion auf die Tumorentwicklung ist, sondern auch der Neoplasie vorausgehen und damit die maligne Transformation von Zellen stimulieren kann. DeFilippis et al. beschrieben dies 2012 bereits für das Mammakarzinom. Betrachtet man die für das CCC bekannten Risikofaktoren, welche alle durch eine chronische Inflammation gekennzeichnet sind, muss dieser Effekt auch in Bezug auf die Entstehung des CCC diskutiert werden. Zu diesen Risikofaktoren zählen unter anderem parasitäre Infektionen der Leber und Gallenwege, virale Hepatitiden, eine chronische Hepatocholedocholithiasis und die primär sklerosierende Cholangitis. Im Mausmodell konnte dieser Weg von chronischer Entzündung hin zum CCC bereits bestätigt werden (Farazi et al., 2006). Bei p53-defizienten Mäusen wurde durch eine intermittierende Toxingabe eine chronische Inflammation ausgelöst. Zu beobachten war anschließend eine zunehmende Desmoplasie mit Zunahme der α -smooth-muscle-actin (α SMA) exprimierenden, fibroblastoiden Zellen, gefolgt von einem erhöhten Auftreten von CCCs. Auch bei Patienten mit einem CCC fielen größere Tumore sowie schlechtere Überlebensraten in Korrelation mit der Menge an α SMA-positiven Fibroblasten auf (Chuaysri et al., 2009). Deshalb wurden als grundlegender Ausgangspunkt dieser Arbeit aus Metastasen und Primärtumoren von Patienten mit cholangiozellulärem Karzinom fibroblastoide Zellen gewonnen und in Zellkulturmedium weiter kultiviert. Vorhergehende Arbeiten zu diesem Thema verwandten und beschrieben im Gegensatz dazu häufig nur fibroblastoide Zellen aus nicht Nicht-CCC Stroma. Im Falle der vorliegenden Arbeit wurde der fibroblastoide Charakter von diesen Zellen durch den immunzytochemischen Nachweis von Vimentin bei gleichzeitigem Fehlen von Panzytokeratin nachgewiesen. Weiterhin zeigten die Zellen eine ausgeprägte Positivität für α SMA. Daher wurde davon ausgegangen, dass die gewonnenen Zellen aktivierte TAFs darstellen und damit zur weiteren Untersuchung ihrer Fähigkeit zur Stimulation von CCC-Zellen geeignet sind. Im Verlauf der Arbeit zeigte sich, dass die TAFs auf Dauer nicht stabil in einem Standard-Zellkulturmedium kultiviert werden konnten. Über die Zeit ließ die Rate an Zellteilung nach,

bis schließlich nach 20 Passagen kaum mehr eine Vermehrung erreicht werden konnte. Um einen realitätsnahen Versuchsaufbau zu ermöglichen wurde sich gegen die Immortalisierung der Zellen und für den Gebrauch der primären Zellen entschieden. Daher fanden für die anschließenden Versuche nur TAFs bis maximal in die 15. Passage Verwendung. TAFs wuchsen im Verbund gemeinsam mit anderen Zellen (Affo et al., 2017). Der Wegfall der parakrinen Interaktion sowie möglicher Zell-Zell oder Zell-Matrix Kontakte in Kombination mit dem fortgeschrittenen Alter der Spender-Patienten könnten mögliche Erklärungen für das reduzierte Wachstum in einer langfristigen Zellkultur sein.

6.2 Durch parakrine Mediatoren vermittelte Stimulation cholangiozellulärer Tumorzellen

Im modifizierten Boydenchamberversuch wurde das Invasionsverhalten von den zwei cholangiozellulären Tumorzelllinien TFK-1 und HuCCT-1 untersucht. HuCCT-1 entstammt ursprünglich aus dem Resektat eines intrahepatischen CCCs, TFK-1 aus einem extrahepatischen. In diesem Versuchsaufbau kann ein Mischeffekt aus Zellproliferation und Migration auf das Gesamtergebnis der gezählten Zellen nicht sicher ausgeschlossen werden. Um den Einfluss der Zellteilung möglichst gering zu halten wurde im Versuchsaufbau eine Zeitspanne, welche deutlich unter der Verdopplungszeit der Tumorzellen liegt, gewählt. Es ließ sich feststellen das die TFK-1 Zellen sowohl durch fibroblasten-konditioniertes Medium (KM) als auch durch parakrine Ko-Kultur mit TAFs, nicht jedoch durch fetales Kälberserum (FCS) in ihrem Invasionsverhalten signifikant stimuliert werden können. HuCCT-1 hingegen zeigte bereits ohne Stimulation eine Migrationstendenz. Diese konnte durch KM nicht weiter gesteigert werden. FCS und die Ko-Kultur führen jedoch zu einer signifikanten Steigerung der abschließend gemessenen Zellzahlen.

Ähnliche Effekte von TAFs konnten auch bereits für andere Tumorentitäten gezeigt werden. So führt zum Beispiel die Präsenz von Tumorfibroblasten bei Magenkarzinomzellen (Yamaguchi et al., 2014), Bronchialkarzinomen (Neri et al., 2017) oder Pankreaskarzinomen (Hwang et al., 2008) zu einer gesteigerten Tumordinvasion. Auch zum intrahepatischen Cholangiokarzinom lagen vor dieser Arbeit schon ähnliche Daten vor. So konnten Okabe et al. 2011 zeigen, dass α SMA-positive, hepatische Sternzellen über ausgeschüttete Botenstoffe zur Invasivitätssteigerung von CCC-Zellen beitragen. Ebenso konnte auch unsere Arbeitsgruppe bereits mehrfach zeigen dass TAFs verschiedenste Mediatoren sezernieren können, die dafür bekannt sind zur Stimulation von Tumorzellen zu führen (Bernsmeier et al., 2014; Heits et al., 2016).

Im Weiteren wurde deshalb vermutet, dass auch im Fall dieser Untersuchung der stimulierende Effekt durch ähnliche, lösliche Mediatoren vermittelt wird. In der Zytokinexpressionmessung konnten als Hauptvertreter CD40-Ligand, Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (G-CSF), GR0 α (CXCL1),

Interleukin-1 Rezeptor Antagonist (IL-1ra), Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 8 (IL-8 oder CXCL8), Interleukin 13 (IL-13), Interleukin 16 (IL-16 oder LCF), Interleukin 17-E (IL-17E oder Interleukin 25), Monozyten Chemotaxis Protein 1 (MCP-1 oder CCL2), Makropagen-Migration-inhibierender-Faktor (MIF oder GIF/DER6) und Serpin E1 (Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1 oder PAI-1) identifiziert werden. Dies deckt sich mit den früheren Befunden unserer Arbeitsgruppe (Bernsmeier et al., 2014; Heits et al., 2016). Die fünf quantitativ am stärksten vertreten Mediatoren in dieser Untersuchung waren GR0 α (CXCL1), IL-6, IL-8, MIF und Serpin E1.

CXCL1 ist als Chemokin für seine physiologische Fähigkeit bekannt die Angiogenese zu unterstützen und die Rekrutierung von Leukozyten zu vermitteln. Es wurde aber auch beobachtet das CXCL1 in Tumoren eine Metastasierung sowie Chemoresistenz fördern kann. 2018 beschrieben Hsu et al. dass CXCL1, sezerniert von dendritischen Zellen die Tumorprogression im Kolonkarzinom fördert. Ähnliche Effekte wurden auch in anderen Tumoren beobachtet. Beim Mammakarzinomen stimuliert CXCL1 über Aktivierung der Proteinkinase Erk die Migration und Invasion der Tumorzellen (Yang et al., 2019) und in Magenkarzinomzellen wurde auch ein invasionssteigernder Effekt über die Aktivierung des Akt-Signalweges nachgewiesen (Z. Wang et al., 2017).

Der Makropagen-Migration-inhibierender-Faktor MIF ist ein wichtiger Bestandteil in der regulären Immunantwort sowie bei Entzündungsreaktionen. MIF wurde ursprünglich als Botenstoff beschrieben der überschießende Immunreaktionen mindern kann und verschiedene Makrophagenfunktionen, wie Phagozytose und Wanderung, verlangsamt (Nishihira, 2000). In den letzten Jahren wurde jedoch wiederholt auch pro-inflammatorische sowie das Tumorwachstum beeinflussende Effekte nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass MIF über Stimulation der Ausschüttung von anderen pro-inflammatorischen Zytokinen, einer dauerhafte Aktivierung von Erk sowie Inhibition des Tumor-Suppressorgens p53 zu einer Tumorprogression beitragen kann (Conroy et al., 2010).

Serpin E1, auch bekannt als Plasminogenaktivatorinhibitor 1 (PAI-1) reguliert physiologisch die Aktivität der Urokinase sowie des Gewebs-PlasminogenAktivators und ist damit in die Steuerung von Gerinnungsprozessen involviert. Ursprünglich wurde daher vermutet, dass diesem Botenstoff eine antitumorale Wirkung innewohnt. Jedoch zeigte sich, dass PAI-1 durch die Stimulation der Angiogenese sowie der Proliferation und Migration vielmehr eine entscheidende Rolle bei der Progression vieler Tumoren zugesprochen werden muss (Kubala & DeClerck, 2019). PAI-1 kann in den meisten soliden Tumoren des Menschen verstärkt nachgewiesen werden. Daher gewann PAI-1 bereits als Biomarker mit hoher prognostischer Relevanz im klinischen Studien an Bedeutung. Die Mechanismen die in diesem Zusammenhang diskutiert werden sind komplex und noch nicht abschließend verstanden. Eine Ursache, die mit der Stimulation der Tumorprogression assoziiert wird ist die Überaktivierung der JAK/STAT beziehungsweise Erk-Signalwege (Kubala & DeClerck, 2019).

Interleukin 6 (IL-6) vermittelt seine Effekte durch die Bindung an membrangebundene oder lösliche IL-6-Rezeptoren und die nachfolgende Aktivierung des Glykoprotein gp130. In Folge werden die JAK/STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription) und MAPK (mitogen-activated protein kinase) Kaskaden aktiviert, was in vielfältigen Effekten resultieren kann. Zum einen wirkt IL-6 als Mediator von Entzündungen und Traumata, senkt Fieber und kann die Ausschüttung anderer Zytokine hemmen. Es ist ebenso in Wundheilungs- und Zelldifferenzierungsprozessen involviert (Kleinegger et al., 2019). Die gleichen Signalwege sind aber auch in diversen soliden Tumoren aktiviert und führen zu einer gesteigerten Invasivität und Proliferation von Karzinomzellen (Hodge et al., 2005). Auch im Zusammenhang mit der Entstehung und Progression von cholangiozellulären Karzinomen wird IL-6 daher breit diskutiert. So wurde zum Beispiel durch Isomoto et al. 2005 beschrieben, dass in CCCs IL-6 vermittelt das anti-apoptotische Protein myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1) induziert wird. Mcl-1 wiederum vermittelt eine Resistenz gegenüber TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand). Außerdem konnte beobachtet werden, dass hohe Serumspiegel von IL-6 bei Patienten mit CCC mit einer schlechteren Prognose einhergehen (Cheon et al., 2007). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Level an IL-6 die von CCC-Zellen endogen produziert werden nur gering sind (Dokduang et al., 2014a; Isomoto et al., 2005). Dies unterstützt die These, dass das Tumorumfeld und damit maßgeblich auch TAFs, über die parakrine Wirkung von löslichen Mediatoren bedeutend an der Entwicklung von CCCs beteiligt ist.

Das Zytokin IL-8 unterstützt ebenfalls in verschiedenen Tumoren das Zellwachstum über eine Bindung an G-Protein-gekoppelte Membranrezeptoren und der anschließenden Aktivierung von PI3K und MAPK Signalwegen. Dieser Einfluss wurde unter anderem bereits für Kolon-, Pankreas- und Mammakarzinome beschrieben (Alfaro et al., 2017; Lee et al., 2012; Matsuo et al., 2009). Da die Serumspiegel von IL-8 in vielen Fällen mit der Schwere des Tumorleidens assoziiert sind, werden diese mittlerweile auch zur Überwachung des Therapieerfolges verwandt (Sanmamed et al., 2014).

Die in dieser Arbeit beobachtete Erhöhung der Invasivität der CCC-Zellen nach Stimulation mit dem durch TAFs konditioniertem Medium wurde daher maßgeblich diesen parakrin wirkenden Mediatoren zugeschrieben. Um dies abschließend zu beweisen wären jedoch weitere Untersuchungen, zum Beispiel mit der gezielten Blockade der einzelnen Zytokine durch spezifische Antikörper, im Rahmen der Stimulation mit konditioniertem Medium notwendig.

6.3 Stimulation intrazellulärer Signalwege beim cholangiozellulären Karzinom

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die TAFs durch die Sezernierung von verschiedenen löslichen Botenstoffen in der Lage sind, in CCC-Zellen intrazelluläre

Signaltransduktionswege zu stimulieren. In der Western Blot Analyse gelang der Nachweis einer gesteigerten Phosphorylierung der Proteinkinasen Akt und Erk sowie des Transkriptionsfaktors STAT3.

Der PI3K/Akt-Signalweg ist einer der wichtigsten intrazellulären Signaltransduktionwege und ist bei vielen Zellvorgängen beteiligt. Über diesen Weg werden Zellwachstum und Proliferation sowie Zellstoffwechsel reguliert. Ein Schlüsselmechanismus hierbei ist die Regulation der zytoplasmatischen beziehungsweise nukleären Lokalisation seiner spezifischen Substrate, welche dann im Zellkern als Transkriptionsfaktoren wirken können. So inaktiviert Akt beispielsweise über eine Phosphorylierung auf Proteinebene die proapoptotischen Faktoren BAD und Pro-Caspase-9 sowie Forkhead-Box-Proteine (FOX). Die Expression von Fas-Ligand, eines weiteren proapoptotischen Faktors, wird so reduziert (Fresno Vara et al., 2004). Zusätzlich wurde für verschiedene Tumorzelllinien gezeigt das Akt auch über eine Desensibilisierung der Zellen gegenüber TRAIL den Zelltod minimiert (Q. Wang et al., 2002). Auf der anderen Seite wirkt Akt auch über die Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren 'cAMP-response element binding'-Protein (CREB) und der I κ B-Kinase, welche beide die Expression anti-apoptotischer Gene regulieren. Weiterhin hat Akt auch einen Einfluss auf die Zellzyklusprogression und das Zellwachstum über verschiedenste nachgeschaltete Wege. Ein wichtiger Vertreter ist in diesem Zusammenhang 'mechanistic Target of Rapamycin' (mTOR). Der PI3K/Akt/mTOR Signalweg ist in vielen Tumoren hyperaktiviert und bewirkt über seine Hochregulierung eine Wachstumssignalautonomie, eine Insensitivität gegenüber antiproliferativen Signalen, eine Hemmung der Apoptose sowie Stimulierung der Angiogenese (Aoki & Fujishita, 2017; Ersahin et al., 2015). Für das CCC konnten Yothaisong et al. 2013 eine verstärkte Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges in mehr als 50 % der untersuchten Tumorgewebe von Patienten sowie in Zelllinien nachweisen. Außerdem zeigte sich eine Korrelation diese Erhöhung mit einer schlechteren Prognose. Ausgehend von diesen Erkenntnissen befinden sich bereits verschiedene experimentelle PI3K/Akt-Inhibitoren in der präklinischen Erprobung.

Die 'Extracellular-signal regulated Kinases' (Erks) gehören zur Gruppe der Mitogen-aktivierten Kinasen (MAP-Kinasen). Sie können über verschiedene extrazelluläre Signale aktiviert werden und regulieren ihrerseits zelluläre Prozesse wie Zelldifferenzierung und Proliferation. Der MAPK/Erk Signalweg, oder auch bekannt als Ras-Raf-MEK-Erk Signalweg ist eine Kette von Proteinen welche die Signale membranständiger Rezeptoren über verschiedene Proteasen bis zur Gentranskription kaskadenartig übersetzten und zu einer gesteigerten Proliferation und Überleben der Zellen führen. Die dabei ablaufenden Prozesse sind unter normalen Umständen durch andere Proteasen bidirektional streng reguliert (Mendoza et al., 2011). Dazu gehören auch Akt und mTOR. In vielen Tumoren kann beobachtet werden, dass diese Regelkreise gestört sind und es durch Mutationen zur abnormen Aktivierung des Ras-Raf-MEK-ERK Signalweges kommt. Unterschiedliche Mutationen in der

Signalkaskade konnten so zum Beispiel in Melanomen, kolorektalen Karzinomen oder Ovarialkarzinomen nachgewiesen werden (Burotto et al., 2014). Auch für das cholangiozelluläre Karzinom konnten Mutationen mit nachfolgender Stimulation in diesem Signalweg gezeigt werden (Sia et al., 2013). Der gezielten Inaktivierung dieser mutierten Moleküle kommt in der aktuellen onkologischen Forschung ein großer Stellenwert zu.

Die Überaktivierung von 'Signal-transducer and activator of transcription 3' (STAT3) durch Zytokine, unter anderem aus der IL-6 Familie, ist für verschiedene solide Tumoren ausgiebig beschrieben. Auch bei der Karzinogenese des cholangiozellulären Karzinoms spielt STAT3 als Transkriptionsfaktor für Gene die Proliferation, Invasion und Apoptose steuern eine entscheidende Rolle (Xiong et al., 2014). Physiologisch kommt es nach der Bindung von Wachstumsfaktoren oder Zytokinen an membranständige Rezeptoren zur Aktivierung von Januskinasen was schlussendlich in einer Phosphorylierung und Dimerisierung von STAT3 mündet. Danach kommt es zu einer Translokation des Proteins in den Zellkern wo STAT3 dann spezifische DNA-Sequenzen binden und als Transkriptionsfaktor die Genexpression reguliert (Schust et al., 2006). Dieser IL-6/STAT3 Achse scheint bei der Progression des CCC eine große Bedeutung zuzukommen. Bereits 2005 konnte von Isomoto et al. gezeigt werden, dass IL-6 zu einer Überaktivierung von STAT3 in CCCs führen kann, nicht aber in normalen Cholangiozyten. Diese Überaktivierung geht nachweislich mit einer schlechteren Prognose für CCC einher und könnte sich in der klinischen Diagnostik als prognostischer Faktor erweisen (Dokduang et al., 2014).

In dieser Arbeit konnte die gesteigerte Phosphorylierung der entsprechenden Proteasen Akt und Erk sowie von STAT3 bei CCC Zellen bereits nach wenigen Minuten Inkubation mit TAF-konditioniertem Medium gemessen werden. Diese hielt über mehrere Stunden an. Es ist anzunehmen, dass über die Aktivierung dieser Signalwege der Haupteffekt der TAF-bedingten Stimulation der CCC Zellen vermittelt wird. Um die Wirkung der verschiedenen Komponenten des konditionierten Mediums weiter zu verstehen, wäre es jedoch notwendig die aufgeschlüsselten Mediatoren einzeln auf deren Einfluss auf die beschriebenen Signalwege zu untersuchen. Auch erscheint die weitere Untersuchung des parakrinen Einflusses von TAFs auf CCCs vielversprechend. Um den Einfluss auf Migration und Proliferation weiter zu differenzieren könnte sich beispielsweise ein Chemotaxis Versuchsaufbau oder Wundheilung-Versuch in einem 'Live-Cell-Imaging'-System wie JuLi™-Stage als erkenntnisreich erweisen.

6.4 Der Einfluss immunsuppressiver Medikamente auf CCCs und TAFs

6.4.1 Cyclosporin A

Das Immunsuppressivum Cyclosporin A (CsA) ist einer der wichtigsten Wirkstoffe in der Prävention akuter und chronischer Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation. Dabei ist seine Wirkung maßgeblich durch die Inhibition der Sekretion von Interleukin 2 (IL-2) aus T-Zellen sowie die Stimulation der Sekretion von TGF- β , einem starken Inhibitor der T-Zell Proliferation, zurückzuführen. Der Einfluss von CsA auf cholangiozelluläre Karzinome, gerade in Hinblick auf die potenzielle Möglichkeit des Einsatzes nach einer Lebertransplantation bei frühen, aber sonst inoperablen perihilärem cholangiozellulärem Karzinom ist bis jetzt nicht untersucht. Bereits bekannt und allgemein akzeptiert ist, dass CsA bei Patienten nach Organtransplantation das Risiko des Auftretens von Hauttumoren, Nierenzelltumoren und Lymphomen erhöht (Tremblay et al., 2002). Weiterhin wurde bei Patienten die CsA nach einer Lebertransplantation im Rahmen eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) erhielten ein negativer, kumulativ-dosisabhängiger Effekt auf das Langzeitüberleben festgestellt (Vivarelli et al., 2002). Diese Ergebnisse passen mit Experimenten zusammen die im Rattenmodell eine höhere Rezidivrate von HCCs nach Lebertransplantation unter Therapie mit CsA zeigen (Freise et al., 1999). Tjon et al. beschrieben 2010 ebenfalls ein erhöhtes Auftreten von verschiedenen Tumorentitäten nach Lebertransplantation mit anschließender CsA Behandlung. Verglichen wurde dort die Behandlung unter anderem mit Tacrolimus, ebenfalls ein Medikament aus der Gruppe der Calcineurininhibitoren. Weiterhin muss diskutiert werden, dass der tumorprogressive Effekt von CsA durch andere Risikofaktoren ausgelöst oder verstärkt werden kann. So berichten Marcil & Stern 2001 von einem erhöhten Risiko für Plattenepithelkarzinome der Haut nach der Behandlung von Psoriasispatienten mit CsA in Kombination mit ultravioletter Lichtexposition.

Dem gegenüber stehen Beobachtungen zu reduziertem Auftreten von Rektumkarzinomen und Mammakarzinomen (Stewart et al., 1995, 1997) sowie in vitro Studien zur Reduktion der Proliferation und Migration von Harnblasen- und Prostatakarzinomzellen unter einer CsA Therapie (Kawahara, Kashiwagi, Ide, Li, Zheng, Ishiguro, et al., 2015; Kawahara, Kashiwagi, Ide, Li, Zheng, Miyamoto, et al., 2015). Weiterhin wurde berichtet, dass CsA bei Magenkarzinomzellen die Proliferation hemmt und Apoptose induzieren kann (Xing et al., 2016). Die genaue Ursache-Wirkungsbeziehung zwischen den Calcineurininhibitoren und der Stimulation beziehungsweise Inhibition der Tumorprogression bleiben somit nicht komplett verstanden und gerade in Bezug auf deren Einsatz als Immunsuppressivum nach Organtransplantation weiterhin diskussionswürdig.

Bei der in dieser Arbeit durchgeführte Messung der Zellviabilität sowie der Messung des Einflusses auf das Invasionsverhalten der CCC-Zellen zeigte die Behandlung mit CsA keinen relevanten Effekt. Tumorprogressive Effekte über die Steigerung der Sekretion von Zytokinen (Hojo et al., 1999) oder

Aktivierung von intrazellulären Signalwegen (Datta et al., 2009; Han et al., 2010), wie sie durch andere Autoren beschrieben wurden, demaskierten sich in diesem Ko-Kultur Versuchsaufbau nicht. Möglicherweise könnten längere Behandlungsdauern sowie Messungen der sezernierten Zytokinmengen nach Behandlung weiteren Aufschluss liefern. Zusätzliche In-vitro Studien sind hier notwendig. Auf Grundlage des ausbleibenden Effektes auf die Zellviabilität und Invasivität der Tumorzellen in diesem Setting wurde sich gegen eine weiterführende Untersuchung zu Effekten von CsA entschlossen.

6.4.2 Mycophenolsäure

Die Substanz Mycophenolsäure beziehungsweise ihre Prodrugs Mycophenolatmofetil und Mycophenolat-Natrium werden seit einigen Jahren gern zur Langzeitprävention von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen eingesetzt (Manzia et al., 2005). Zusätzlich zu ihrer gut dokumentierten, immunsuppressiven Wirkung durch die Hemmung der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) und damit der de-novo Guanosinmonophosphat Synthese wird in den letzten Jahren aber auch vermehrt deren anti-neoplastischen Eigenschaften untersucht. Ein genereller, progressionshemmender Effekt ist schon lang bekannt. Bereits kurz nach seiner Isolierung aus *Penicillium* Kulturen wurden antibakterielle, antivirale und antitumorale Effekte von MPA beobachtet (Williams et al., 1968). In den letzten Jahren konnte nachgewiesen werden, dass MPA über die Hemmung von IMPH, besonders durch die IMPH2 Inhibition, die Proliferation verschiedener Tumoren hemmen und Apoptose induzieren kann (Takebe et al., 2006; Tressler et al., 1994; Végso et al., 2007). Für das hepatozelluläre Karzinom (HCC) konnten kürzlich Chen et al. in 2019 sowohl im Mausmodell nachweisen, dass die MPA-Therapie zu einem verminderten Wachstum des Tumorgewebes als auch bei der Therapie von Patienten mit HCC zu einer geringeren Lokalrezidivrate führt. Ein Mechanismus der hier zusätzlich zur Inhibition von IMPDH diskutiert wird ist die Induktion des p53-Proteins und weiterer, durch p53-regulierte Proteine. Ein solcher Anstieg des p53-Protein Levels könnte in Folge zu einem Zellzyklusarrest während der S-Phase und Induktion von Apoptose in Folge von DNA-Schädigung führen (Takahashi et al., 2011). Allerdings ist dieser Effekt auf wt-p53 Zellen beschränkt.

Aufgrund der fehlenden Nierentoxizität im Vergleich zu anderen Immunsuppressiva und den vorbeschriebenen antitumoralen Effekten bietet MPA eine Alternative zur sonstigen immunsuppressiven Therapie, beispielsweise mit Calcineurininhibitoren. Der Einfluss von MPA auf cholangiozelluläre Tumore wurde bislang jedoch noch nicht untersucht.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der CCC-Zelllinien TFK-1 und HuCCT-1 mit klinisch üblichen Dosierungen von MPA zu einem starken Rückgang der Zellviabilität führt. Dementgegen zeigt MPA nach 96-stündiger Behandlung auch in hohen Dosierungen kaum einen Einfluss auf das Wachstum von TAFs. Dies ist vermutlich den unterschiedlichen Zellverdopplungszeiten und dem damit verbundenen geringeren Effekt der Hemmung der IMPDH geschuldet. Dies legt auch eine Untersuchung von Chen et al. aus 2015 nahe. Sie konnten zeigen, dass schnellproliferierende Zellen stärker durch MPA inhibiert werden können als langsam proliferierende. Was in der Untersuchung weiterhin zu beobachten war ist, dass auch in den höchsten, getesteten Dosierungen keine Reduktion der CCC-Zellzahl auf null erreicht werden konnte. Dafür könnte es verschiedene Erklärungen geben. Eine mögliche Ursache könnten residuale Level an Guanosinphosphaten in den Tumorzellen, beziehungsweise die Wiederverwertung von Abbauprodukten über sogenannte Salvage-Pathways sein. Experimentell induzierte Blockaden der Bindungsstellen von MPA an IMPDH in verschiedenen Tumorzellen konnten ebenfalls den inhibitorischen Effekt von MPA unterbinden (Chen et al., 2015).

Für diese Arbeit wurde auch der Einfluss von MPA in einer niedrigen, sub-klinischen Dosierung auf CCC-Zellen in Ko-Kultur mit TAFs untersucht. Diese niedrige Dosierung wurde gewählt um potentielle Effekte in der Ko-Kultur von dem bereits bekannten Einfluss auf die Zellviabilität zu unterscheiden. Ein zusätzlicher Effekt dieser niedrigen Dosierung, auf die durch TAFs vermittelte Stimulation der CCC-Zellen, konnte jedoch nicht festgestellt werden. Möglicherweise war die in diesem Testsetting verwendete Dosierung zu niedrig um eine wirksame Hemmung der IMPDH in den Tumorzellen oder TAFs zu erreichen. Weitere in-vitro Untersuchungen in einem geänderten Versuchsaufbau könnten hier hilfreich sein. Durch eine Behandlung der Zellen mit MPA, bevor die Zellen in Ko-Kultur gebracht werden, könnte ein möglicher Messfehler durch veränderte Zellzahlen minimiert werden. Dann wären gegebenenfalls auch höhere Dosierungen an MPA möglich und sinnvoll zu testen. In Anbetracht der guten Ergebnisse in der Reduktion der Zellviabilität von CCC-Zellen und den ersten klinischen Erfolgen, beispielsweise bei der Therapie des HCC (Chen et al., 2019), erscheint eine weitere Untersuchung des Einflusses von MPA als Immunsuppressivum nach Lebertransplantation beim CCC ebenfalls sinnvoll.

6.4.3 Everolimus

Über die Bindung an den 'FK-binding protein complex' (FKBP-12) und der damit verbundenen Blockade des mTOR-Komplexes vermitteln Rapamycin und dessen Derivate, darunter auch Everolimus, seine Haupteffekte. Es folgt die Herunterregulierung von nachgeschalteten Proteinkinasen und spezifischen mRNAs, welche für den Zellzyklusfortschritt notwendig sind. Diese Wirkung, welche schlussendlich in einer effektiven Blockade der Interleukin 2 vermittelten Aktivierung von Lymphozyten resultiert, ist

der Hauptgrund für die immunsuppressiven Effekte der mTOR-Inhibitoren. Bereits frühe Studien beschrieben jedoch auch antitumorale Effekte dieser Wirkstoffklasse (Eng et al., 1984). Das Interesse an diesen Effekten ließ im Verlauf jedoch nach und die mTOR Inhibitoren wurden unter dem Gesichtspunkt der Immunsuppression weiterentwickelt. Erst in den letzten Jahren keimte das Interesse wieder auf und es konnte gezeigt werden, dass Rapamycinanaloge, sowie Zweit- und Drittgenerations Präparate einen Stellenwert in der Therapie verschiedener solider Tumoren besitzen (Tian et al., 2019). Everolimus als ein klassisches Rapamycinderivat ist so aktuell auch zur Behandlung von Nierenzellkarzinomen, von fortgeschrittenen hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen sowie neuroendokrinen Tumoren zugelassen. Dabei wirkt Everolimus, im Gegensatz zu neueren Zweit- und Drittgeneration mTOR-Inhibitoren, auf Grund der unterschiedlichen Zusammensetzung der regulatorischen Untereinheiten von mTORC1 und mTORC2 nur über die Hemmung des 'mechanistic-Target of Rapamycin Komplexes 1' (mTORC1) (Faivre et al., 2006).

mTORC2 kann durch verschiedene Wachstumsfaktoren direkt über Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) aktiviert werden. Dies sorgt für die Phosphorylierung von anderen Proteinen, wie zum Beispiel Akt, und reguliert die Aktivität der nachgeschalteten GTPasen Rac und Rho, welche wiederum mit der Ausbildung des Aktin Zytoskelettes, dem Zellüberleben und der Migration assoziiert sind (Pópulo et al., 2012). Es wird davon ausgegangen, dass mTORC2 gegenüber Rapamycin resistent ist. Jedoch wurde beschrieben, dass Langzeitbehandlungen mit Rapamycin über mehr als 24 Stunden zur Behinderung der mTORC2 Bildung durch eine Störung der de-novo Synthese von mTOR-Molekülen führen kann (Sarbasov et al., 2006).

Die mTORC1 Signalkaskade wird über PI3K und die darüber phosphorylierte Proteinkinase Akt aktiviert. Diese Aktivierung führt zur Phosphorylierung der nachgeschalteter Moleküle S6K1 und 4EBP1, welche zur Translation verschiedener mRNAs beitragen. In Folge dessen kommt es zu einem beschleunigten Zellwachstum, einer gesteigerten Proliferation sowie verbessertem Überleben gerade in Tumorzellen (Pópulo et al., 2012). Über die Inhibition dieses Signalweges vermittelt Everolimus wahrscheinlich ausschließlich zytostatischen Effekte. Eine explizite Zytotoxizität konnte bislang nicht beobachtet werden.

Dies deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Es konnte gezeigt werden, dass Everolimus dazu in der Lage ist die Zellviabilität von CCC-Zellen bereits in niedriger, subklinischer Dosierung signifikant zu reduzieren. Jedoch war das Gesamtausmaß mit einer Reduktion um etwa 25% im Falle der HuCCT-1 und um 44% im Falle der TFK-1 auch in höheren Dosierungen verhältnismäßig gering. Dies spricht dafür, dass in diesen Tumorzellen gegensinnige Signalwege ablaufen. Vielmehr konnte beobachtet werden, dass die Behandlung mit Everolimus in niedriger Konzentration zu einer eigenständigen Phosphorylierung von Akt führt. Gleiches beschrieben O'Reilly et al. 2006 bereits für

Rapamycin und vermuteten einen zugrundeliegenden Mechanismus durch die Hochregulierung von parallel ablaufenden Feedbackschleifen.

Weiterhin fand sich, dass Everolimus einen gleichsinnigen Einfluss auf tumorassoziierte Fibroblasten zeigte. Auch hier war eine Reduktion der Viabilität um etwa 20% zu verzeichnen. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass Everolimus dazu in der Lage ist der durch TAFs vermittelten Stimulation der Invasion von CCC-Zellen entgegenzuwirken. Es muss dabei jedoch diskutiert werden ob der gemessene Effekt einzig der Hemmung dieser parakrinen Stimulation geschuldet ist oder nicht auch zum Teil durch eine, wie bereits zuvor beschriebene, direkt zytostatische Wirkung auf die CCC-Zellen bedingt war. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass die Behandlung von TAFs mit Everolimus zu einer Reduktion von sezernierten Zytokinen wie IL-6 führen kann (Heits et al., 2016). Daher wurde in dieser Arbeit der Einfluss von IL-6 weiter untersucht und es konnte festgestellt werden, dass eine 24-stündige Behandlung mit Everolimus in einer Konzentration von 1 μ mol die IL-6 vermittelte Aktivierung von STAT3 in den CCC-Zellen reduzieren kann. Dieser Effekt ist höchstwahrscheinlich auf Interaktionen zwischen mTORC1 und STAT3 zurückzuführen. Auch in andern Zellen konnten ähnliche regulatorisch hemmende Schleifen bereits nachgewiesen werden (Bezzetti et al., 2016).

Im Versuchsaufbau mit der Stimulation durch fibroblastenkonditioniertes Medium (KM) konnten diese Ergebnisse jedoch nicht reproduziert werden. Auch eine zuvor durchgeführte Behandlung der TAFs mit Everolimus in der gleichen Konzentration änderte daran nichts. Einen Effekt auf die durch KM verstärkte Phosphorylierung von Akt und Erk zeigte sich ebenso nicht. Eine mögliche Erklärung ist, dass durch in den CCC Zellen simultan ablaufende Signaltransduktionswege sowie die diversen parakrinen Mediatoren bereits geringe Mengen der unterschiedlichen Zytokine und Wachstumsfaktoren ausreichen um in der Summe eine maximale Reaktion hervorzurufen. Geringe Änderungen in der sezernierten Zytokinmenge, beziehungsweise geringe intrazelluläre Hemmung der Signalwege über mTORC1 reichen dann eventuell nicht aus um einen Effekt zu demaskieren. Diese These wird auch durch andere Autoren unterstützt. So stellten Tian et al. 2019 heraus, dass Everolimus und andere Erstgenerations-Rapamycinanaloga trotz ihrer vielversprechenden in-vitro Ergebnisse in-vivo deutlich geringere Effekte zeigen. Sie führen dies auf die isolierte Hemmung des mTORC1 sowie konsekutiv aktivierte, regulatorische Feedbackschleifen zurück. Eine duale Hemmung von mTORC1 und mTORC2 sowie zusätzliche Inhibition von anderen Schlüsselsignalwegen könnte die Wirksamkeit verbessern. Dies konnte bereits im Rahmen der akuten myeloischen Leukämie erfolgreich gezeigt werden (Altman et al., 2011). Neue Generationen von mTOR-Inhibitoren, welche nicht spezifisch für einen mTOR-Komplex sind, sowie duale PI3K/mTOR-Inhibitoren befinden sich derzeit für diverse Tumore in der präklinischen und klinischen Erprobung (Tian et al., 2019).

In der Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit sowie der aktuellen Entwicklung könnte es sich als vielversprechend erweisen mTOR-Inhibitoren sowie Inhibitoren der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase wie Mycophenolsäure als Bestandteil der immunsuppressiven Strategie bei Transplantationspatienten, gerade bei solchen mit CCCs, weiter zu untersuchen und als Ergänzung zu adjuvanten Chemotherapie-Schemata in Betracht zu ziehen.

7 Zusammenfassung

Die Diagnose eines cholangiozellulären Karzinoms geht aufgrund der stark limitierten kurativen Behandlungsmöglichkeiten und des rasch vorschreitenden Tumorwachstums mit einer sehr schlechten Prognose einher. Zwar befinden sich systemisch-medikamentöse Therapien in der Erprobung, diese können momentan jedoch nur unterstützend zur operativen Resektion wirken. Bei Patienten mit früher Diagnose eines jedoch nicht resektablen, perihilären CCC bietet die orthotope Lebertransplantation eine mögliche Alternative zu diesem Therapiekonzept. Dadurch ist innerhalb dieser hochselektionierten Patientengruppe eine deutliche Verbesserung der Prognose erreichbar.

Um die Entstehung und Progression eines Tumors zu verstehen ist es notwendig auch das Tumorzell-umgebenden Gewebe mit zu betrachten. Alpha-smooth-muscle-actin- (α SMA-) positive Fibroblasten konnten als Hauptvertreter der tumorassoziierten Zellen im entzündlichen Tumorstroma von CCCs als funktionell entscheidender Parameter identifiziert werden. In diesem Zusammenhang ist der Einfluss einer immunsuppressiven Therapie, die sich an jede Organtransplantation anschließen muss, bislang noch kaum verstanden.

Daher sollte es Ziel der vorliegenden Arbeit sein, die Wirkung verschiedener typischer Immunsuppressiva (Cyclosporin A, Mycophenolsäure und Everolimus) auf cholangiozelluläre Tumorzellen und tumorassoziierte Fibroblasten (TAFs) hin zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden erfolgreich primäre TAFs aus Resektaten von Patienten isoliert und kultiviert. Es konnte gezeigt werden, dass diese über proinflammatorische Zytokine wie IL-6, IL-8, CXCL1, MIF und Serpin E1 in der Lage sind die CCC-Zelllinien HuCCT-1 und TFK-1 zu stimulieren. Als intrazelluläre Signalwege für deren Wirkung konnten STAT3, Akt und Erk bestätigt werden. Sowohl durch die Behandlung mit Mycophenolsäure als auch mit Everolimus ließ sich die Zellviabilität der CCC-Zellen dosisabhängig deutlich reduzieren. Unter der maximalen Konzentration von Mycophenolsäure wurde nach 24 Stunden eine Reduktion um 30 % (TFK-1) bzw. 28 % (HuCC-1) erreicht sowie um bis zu 81 % (TFK-1) bzw. 66 % (HuCC-1) nach 96 Stunden. Durch Everolimus wurde die Viabilität um 26 % (TFK-1) bzw. 20 % (HuCC-1) nach 24 Stunden sowie um 43 % (TFK-1) bzw. 15 % (HuCC-1) nach 96 Stunden reduziert. Cyclosporin A zeigte keinen Effekt. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass durch Everolimus der Ko-Kultur-vermittelte, stimulierende Effekt von TAFs auf CCC-Zellen gemindert werden kann. Eine Reduktion der migrierten Zellen um 42 % bei TFK-1 bzw. um 28 % bei HuCC-1 gegenüber der unbehandelten Kontrolle waren nachweisbar. Bezüglich des Wirkmechanismus konnte gezeigt werden, dass Everolimus die Interleukin-6 vermittelte Aktivierung von STAT3 in den CCC-Zellen reduziert.

In Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit und den vielversprechenden Erfolgen nach Lebertransplantationen bei phCCC-Patienten ergibt sich daraus die Implikation gegebenenfalls bewährte Therapieschemata durch den gezielten Einsatz von ausgewählten Immunsuppressiva wie Mycophenolsäure oder Everolimus zu ergänzen. Gerade im Hinblick auf die limitierte und wohl auch in Zukunft kaum steigende Anzahl an verfügbaren Spenderorganen erscheint eine individuelle Abwägung der spezifischen Vor- und Nachteile der eingesetzten immunsuppressiven Medikamente unerlässlich.

8 Literaturverzeichnis

- Affo, S., Yu, L.-X., & Schwabe, R. F. (2017). The Role of Cancer-Associated Fibroblasts and Fibrosis in Liver Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 12(1), 153–186.
- Alfaro, C., Sanmamed, M. F., Rodríguez-Ruiz, M. E., Teijeira, Á., Oñate, C., González, Á., Ponz, M., Schalper, K. A., Pérez-Gracia, J. L., & Melero, I. (2017). Interleukin-8 in cancer pathogenesis, treatment and follow-up. In *Cancer Treatment Reviews* (Vol. 60, pp. 24–31). W.B. Saunders Ltd.
- Allison, A. C., & Eugui, E. M. (2005). Mechanisms of action of mycophenolate mofetil in preventing acute and chronic allograft rejection. In *Transplantation* (Vol. 80, Issue SUPPL. 2).
- Altman, J. K., Sassano, A., Kaur, S., Glaser, H., Kroczyńska, B., Redig, A. J., Russo, S., Barr, S., & Platanias, L. C. (2011). Dual mTORC2/mTORC1 targeting results in potent suppressive effects on Acute Myeloid Leukemia (AML) progenitors. *Clinical Cancer Research*, 17(13), 4378–4388.
- Andersen, J. B., Spee, B., Blechacz, B. R., Avital, I., Komuta, M., Barbour, A., Conner, E. A., Gillen, M. C., Roskams, T., Roberts, L. R., Factor, V. M., & Thorgeirsson, S. S. (2012). Genomic and genetic characterization of cholangiocarcinoma identifies therapeutic targets for tyrosine kinase inhibitors. *Gastroenterology*, 142(4), 1021–1031.e15.
- Aoki, M., & Fujishita, T. (2017). Oncogenic Roles of the PI3K/AKT/mTOR axis. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 407, pp. 153–189). Springer Verlag.
- Azare, J., Doane, A., Leslie, K., Chang, Q., Berishaj, M., Nnoli, J., Mark, K., Al-Ahmadie, H., Gerald, W., Hassimi, M., Viale, A., Stracke, M., Lyden, D., & Bromberg, J. (2011). Stat3 mediates expression of autotaxin in breast cancer. *PloS One*, 6(11), e27851.
- Bergquist, A., & Von Seth, E. (2015). Epidemiology of cholangiocarcinoma. In *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology* (Vol. 29, Issue 2, pp. 221–232). Bailliere Tindall Ltd.
- Bernsmeier, A., Heinze, T., Heits, N., Kerber, J., Becker, B., Braun, F., Kalthoff, H., & Eberts, J. (2014). The paracrine interaction of Cholangiocellular Tumor Cells and Cancer-associated Fibroblasts activates the JAK/STAT signaling pathway and increases phosphorylation of ERK in CCC Cell Lines HuCCT1 and TFK1. *Langenbeck's Archives of Surgery*, 399(3), 371–413.
- Bezzerri, V., Vella, A., Calcaterra, E., Finotti, A., Gasparello, J., Gambari, R., Assael, B. M., Cipolli, M., & Sorio, C. (2016). New insights into the Shwachman-Diamond Syndrome-related haematological disorder: Hyper-activation of mTOR and STAT3 in leukocytes. *Scientific Reports*, 6.
- Blechacz, B. (2017). Cholangiocarcinoma: Current knowledge and new developments. *Gut and Liver*, 11(1), 13–26.
- Blechacz, B., Komuta, M., Roskams, T., & Gores, G. J. (2011). Clinical diagnosis and staging of cholangiocarcinoma. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 8(9), 512–522.
- Bridgewater, J., Galle, P. R., Khan, S. A., Llovet, J. M., Park, J. W., Patel, T., Pawlik, T. M., & Gores, G. J. (2014). Guidelines for the diagnosis and management of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Journal of Hepatology*, 60(6), 1268–1289.
- Brivio, S., Cadamuro, M., Strazzabosco, M., & Fabris, L. (2017). Tumor reactive stroma in cholangiocarcinoma: The fuel behind cancer aggressiveness. *World Journal of Hepatology*, 9(9), 455–468.
- Bundesärztekammer. (2019). Richtlinien zur Organtransplantation Leber. *Deutsches Ärzteblatt*.

- Burotto, M., Chiou, V. L., Lee, J. M., & Kohn, E. C. (2014). The MAPK pathway across different malignancies: A new perspective. In *Cancer* (Vol. 120, Issue 22, pp. 3446–3456). John Wiley and Sons Inc.
- Chen, K., Cao, W., Li, J., Sprengers, D., Hernanda, P. Y., Kong, X., Van Der Laan, L. J., Man, K., Kwekkeboom, J., Metselaar, H. J., Peppelenbosch, M. P., & Pan, Q. (2015). Differential sensitivities of fast-and slow-cycling cancer cells to inosine monophosphate dehydrogenase 2 inhibition by mycophenolic acid. *Molecular Medicine*, 21, 792–802.
- Chen, K., Sheng, J., Ma, B., Cao, W., Hernanda, P. Y., Liu, J., Boor, P. P. C., Tjon, A. S. W., Felczak, K., Sprengers, D., Pankiewicz, K. W., Metselaar, H. J., Ma, Z., Kwekkeboom, J., Peppelenbosch, M. P., & Pan, Q. (2019). Suppression of Hepatocellular Carcinoma by Mycophenolic Acid in Experimental Models and in Patients. *Transplantation*, 103(5), 929–937.
- Cheon, Y. K., Cho, Y. D., Moon, J. H., Jang, J. Y., Kim, Y. S., Kim, Y. S., Lee, M. S., Lee, J. S., & Shim, C. S. (2007). Diagnostic utility of interleukin-6 (IL-6) for primary bile duct cancer and changes in serum IL-6 levels following photodynamic therapy. *The American Journal of Gastroenterology*, 102(10), 2164–2170.
- Chuaysri, C., Thuwajit, P., Paupairoj, A., Chau-In, S., Suthiphongchai, T., & Thuwajit, C. (2009). Alpha-smooth muscle actin-positive fibroblasts promote biliary cell proliferation and correlate with poor survival in cholangiocarcinoma. *Oncology Reports*, 21(4), 957–969.
- Clapéron, A., Mergey, M., Aoudjehane, L., Ho-Bouldoires, T. H. N., Wendum, D., Prignon, A., Merabtene, F., Firrincieli, D., Desbois-Mouthon, C., Scatton, O., Conti, F., Housset, C., & Fouassier, L. (2013). Hepatic myofibroblasts promote the progression of human cholangiocarcinoma through activation of epidermal growth factor receptor. *Hepatology*, 58(6), 2001–2011.
- Conroy, H., Mawhinney, L., & Donnelly, S. C. (2010). Inflammation and cancer: macrophage migration inhibitory factor (MIF)--the potential missing link. *QJM : Monthly Journal of the Association of Physicians*, 103(11), 831–836.
- Darwish Murad, S., Kim, W. R., Harnois, D. M., Douglas, D. D., Burton, J., Kulik, L. M., Botha, J. F., Mezrich, J. D., Chapman, W. C., Schwartz, J. J., Hong, J. C., Emond, J. C., Jeon, H., Rosen, C. B., Gores, G. J., & Heimbach, J. K. (2012). Efficacy of neoadjuvant chemoradiation, followed by liver transplantation, for perihilar cholangiocarcinoma at 12 US centers. *Gastroenterology*, 143(1).
- Datta, D., Contreras, A. G., Basu, A., Dormond, O., Flynn, E., Briscoe, D. M., & Pal, S. (2009). Calcineurin inhibitors activate the proto-oncogene Ras and promote protumorigenic signals in renal cancer cells. *Cancer Research*, 69(23), 8902–8909.
- De Vreede, I., Steers, J. L., Burch, P. A., Rosen, C. B., Gunderson, L. L., Haddock, M. G., Burgart, L., & Gores, G. J. (2000). Prolonged disease-free survival after orthotopic liver transplantation plus adjuvant chemoradiation for cholangiocarcinoma. *Liver Transplantation*, 6(3), 309–316.
- DeFilippis, R. A., Chang, H., Dumont, N., Rabban, J. T., Chen, Y. Y., Fontenay, G. V., Berman, H. K., Gauthier, M. L., Zhao, J., Hu, D., Marx, J. J., Tjoe, J. A., Ziv, E., Febbraio, M., Kerlikowske, K., Parvin, B., & Tlsty, T. D. (2012). CD36 repression activates a multicellular stromal program shared by high mammographic density and tumor tissues. *Cancer Discovery*, 2(9), 826–839.
- Dokduang, H., Techasen, A., Namwat, N., Khuntikeo, N., Pairojkul, C., Murakami, Y., Loilome, W., & Yongvanit, P. (2014a). STATs profiling reveals predominantly-activated STAT3 in cholangiocarcinoma genesis and progression. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*, 21(10), 767–776.

- Dokduang, H., Techasen, A., Namwat, N., Khuntikeo, N., Pairojkul, C., Murakami, Y., Loilome, W., & Yongvanit, P. (2014b). STATs profiling reveals predominantly-activated STAT3 in cholangiocarcinoma genesis and progression. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*, 21(10), 767–776.
- Duan, S., Huang, W., Liu, X., Liu, X., Chen, N., Xu, Q., Hu, Y., Song, W., & Zhou, J. (2018). IMPDH2 promotes colorectal cancer progression through activation of the PI3K/AKT/mTOR and PI3K/AKT/FOXO1 signaling pathways 11 Medical and Health Sciences 1112 Oncology and Carcinogenesis. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 37(1).
- Ebata, T., Yokoyama, Y., Igami, T., Sugawara, G., Takahashi, Y., Nimura, Y., & Nagino, M. (2012). Hepatopancreatoduodenectomy for cholangiocarcinoma: A single-center review of 85 consecutive patients. *Annals of Surgery*, 256(2), 297–305.
- Endo, I., Gonen, M., Yopp, A. C., Dalal, K. M., Zhou, Q., Klimstra, D., D'Angelica, M., Dematteo, R. P., Fong, Y., Schwartz, L., Kemeny, N., O'Reilly, E., Abou-Alfa, G. K., Shimada, H., Blumgart, L. H., & Jarnagin, W. R. (2008). Intrahepatic cholangiocarcinoma: Rising frequency, improved survival, and determinants of outcome after resection. *Annals of Surgery*, 248(1), 84–96.
- Eng, C. P., Sehgal, S. N., & Vézina, C. (1984). Activity of rapamycin (ay-22,989) against transplanted tumors. *The Journal of Antibiotics*, 37(10), 1231–1237.
- Ersahin, T., Tuncbag, N., & Cetin-Atalay, R. (2015). The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. *Molecular BioSystems*, 11(7), 1946–1954.
- Faivre, S., Kroemer, G., & Raymond, E. (2006). Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 5, Issue 8, pp. 671–688). Nature Publishing Group.
- Fan, B., Malato, Y., Calvisi, D. F., Naqvi, S., Razumilava, N., Ribback, S., Gores, G. J., Dombrowski, F., Evert, M., Chen, X., & Willenbring, H. (2012). Cholangiocarcinomas can originate from hepatocytes in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 122(8), 2911–2915.
- Farazi, P. A., Zeisberg, M., Glickman, J., Zhang, Y., Kalluri, R., & DePinho, R. A. (2006). Chronic bile duct injury associated with fibrotic matrix microenvironment provokes cholangiocarcinoma in p53-deficient mice. *Cancer Research*, 66(13), 6622–6627.
- Fellenberg, J., Bernd, L., Delling, G., Witte, D., & Zahltan-Hinguranage, A. (2007). Prognostic significance of drug-regulated genes in high-grade osteosarcoma. *Modern Pathology*, 20(10), 1085–1094.
- Freise, C. E., Ferrell, L., Liu, T., Ascher, N. L., & Roberts, J. P. (1999). Effect of systemic cyclosporine on tumor recurrence after liver transplantation in a model of hepatocellular carcinoma. *Transplantation*, 67(4), 510–513.
- Fresno Vara, J. Á., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., & González-Barón, M. (2004). P13K/Akt signalling pathway and cancer. In *Cancer Treatment Reviews* (Vol. 30, Issue 2, pp. 193–204). W.B. Saunders Ltd.
- Fung, J. J., Jain, A., Kwak, E. J., Kusne, S., Dvorchik, I., & Eghtesad, B. (2001). De novo malignancies after liver transplantation: A major cause of late death. *Liver Transplantation*, 7(11 SUPPL. 1), s109–s118.
- Gentilini, A., Pastore, M., Marra, F., & Raggi, C. (2018). The role of stroma in cholangiocarcinoma: The intriguing interplay between fibroblastic component, immune cell subsets and tumor epithelium. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10).

- Gentilini, A., Rombouts, K., Galastri, S., Caligiuri, A., Mingarelli, E., Mello, T., Marra, F., Mantero, S., Roncalli, M., Invernizzi, P., & Pinzani, M. (2012). Role of the stromal-derived factor-1 (SDF-1)-CXCR4 axis in the interaction between hepatic stellate cells and cholangiocarcinoma. *Journal of Hepatology*, 57(4), 813–820.
- Gores, G. J., Darwish Murad, S., Heimbach, J. K., & Rosen, C. B. (2013). Liver Transplantation for Perihilar Cholangiocarcinoma. *Digestive Diseases*, 31(1), 126–129.
- Gores, G. J., Nagorney, D. M., & Rosen, C. B. (2007). Cholangiocarcinoma: Is transplantation an option? For whom? In *Journal of Hepatology* (Vol. 47, Issue 4, pp. 455–459). Elsevier.
- Görtz, A., Franklin, T. J., Dive, C., & Hickman, J. A. (1997). Cell cycle specific induction of HL-60 cell differentiation and apoptosis by mycophenolic acid. *Cell Death and Differentiation*, 4(8), 787–795.
- Gotthardt, D. N., Bruns, H., Weiss, K. H., & Schemmer, P. (2014). Current strategies for immunosuppression following liver transplantation. In *Langenbeck's Archives of Surgery* (Vol. 399, Issue 8, pp. 981–988). Springer Verlag.
- Groner, B., & von Manstein, V. (2017). Jak Stat signaling and cancer: Opportunities, benefits and side effects of targeted inhibition. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 451, 1–14.
- Gulamhusein, A. F., & Sanchez, W. (2015). Liver transplantation in the management of perihilar cholangiocarcinoma. *Hepatic Oncology*, 2(4), 409–421.
- Han, W., Ming, M., He, T. C., & He, Y. Y. (2010). Immunosuppressive cyclosporin A activates AKT in keratinocytes through PTEN suppression: Implications in skin carcinogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 285(15), 11369–11377.
- Heits, N., Heinze, T., Bernsmeier, A., Kerber, J., Hauser, C., Becker, T., Kalthoff, H., Egberts, J. H., & Braun, F. (2016). Influence of mTOR-inhibitors and mycophenolic acid on human cholangiocellular carcinoma and cancer associated fibroblasts. *BMC Cancer*, 16(1).
- Hodge, D. R., Hurt, E. M., & Farrar, W. L. (2005). The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *European Journal of Cancer*, 41(16), 2502–2512.
- Hojo, M., Morimoto, T., Maluccio, M., Asano, T., Morimoto, K., Lagman, M., Shimbo, T., & Suthanthiran, M. (1999). Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature*, 397(6719), 530–534.
- Hong, S. M., Park, C. W., Cha, H. J., Kwon, J. H., Yun, Y. S., Lee, N. G., Kim, D. G., Nam, H. G., & Choi, K. Y. (2013). Rapamycin inhibits both motility through down-regulation of p-STAT3 (S727) by disrupting the mTORC2 assembly and peritoneal dissemination in sarcomatoid cholangiocarcinoma. *Clinical and Experimental Metastasis*, 30(2), 177–187.
- Hsu, Y. L., Chen, Y. J., Chang, W. A., Jian, S. F., Fan, H. L., Wang, J. Y., & Kuo, P. L. (2018). Interaction between tumor-associated dendritic cells and colon cancer cells contributes to tumor progression via CXCL1. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8).
- Hwang, R. F., Moore, T., Arumugam, T., Ramachandran, V., Amos, K. D., Rivera, A., Ji, B., Evans, D. B., & Logsdon, C. D. (2008). Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Research*, 68(3), 918–926.
- Ishitsuka, K., Hideshima, T., Hamasaki, M., Raje, N., Kumar, S., Podar, K., Le Gouill, S., Shiraishi, N., Yasui, H., Roccaro, A. M., Tai, Y. Z., Chauhan, D., Fram, R., Tamura, K., Jain, J., & Anderson, K. C. (2005). Novel inosine monophosphate dehydrogenase inhibitor VX-944 induces apoptosis in multiple myeloma cells primarily via caspase-independent AIF/Endo G pathway. *Oncogene*, 24(38), 5888–5896.

- Isomoto, H., Kobayashi, S., Werneburg, N. W., Bronk, S. F., Guicciardi, M. E., Frank, D. A., & Gores, G. J. (2005). Interleukin 6 upregulates myeloid cell leukemia-1 expression through a STAT3 pathway in cholangiocarcinoma cells. *Hepatology*, 42(6), 1329–1338.
- Jain, J., McCaffrey, P. G., Valge-Archer, V. E., & Rao, A. (1992). Nuclear factor of activated T cells contains Fos and Jun. *Nature*, 356(6372), 801–804.
- Jarnagin, W. R., Fong, Y., DeMatteo, R. P., Gonen, M., Burke, E. C., Bodniewicz, J., Youssef, M., Klimstra, D., & Blumgart, L. H. (2001). Staging, resectability, and outcome in 225 patients with hilar cholangiocarcinoma. *Annals of Surgery*, 234(4), 507–519.
- Kajiyama, K., Maeda, T., Takenaka, K., Sugimachi, K., & Tsuneyoshi, M. (1999). The significance of stromal desmoplasia in intrahepatic cholangiocarcinoma: A special reference of “scirrhous-type” and “nonscirrhous-type” growth. *American Journal of Surgical Pathology*, 23(8), 892–902.
- Kawahara, T., Kashiwagi, E., Ide, H., Li, Y., Zheng, Y., Ishiguro, H., & Miyamoto, H. (2015). The role of NFATc1 in prostate cancer progression: Cyclosporine A and tacrolimus inhibit cell proliferation, migration, and invasion. *Prostate*, 75(6), 573–584.
- Kawahara, T., Kashiwagi, E., Ide, H., Li, Y., Zheng, Y., Miyamoto, Y., Netto, G. J., Ishiguro, H., & Miyamoto, H. (2015). Cyclosporine A and tacrolimus inhibit bladder cancer growth through down-regulation of NFATc1. *Oncotarget*, 6(3), 1582–1593.
- Khan, S. A., Emadossadaty, S., Lade, N. G., Thomas, H. C., Elliott, P., Taylor-Robinson, S. D., & Toledano, M. B. (2012). Rising trends in cholangiocarcinoma: Is the ICD classification system misleading us? *Journal of Hepatology*, 56(4), 848–854.
- Khan, S. A., Taylor-Robinson, S. D., Toledano, M. B., Beck, A., Elliott, P., & Thomas, H. C. (2002). Changing international trends in mortality rates for liver, biliary and pancreatic tumours. *Journal of Hepatology*, 37(6), 806–813.
- Kirchner, G. I., Meier-Wiedenbach, I., & Manns, M. P. (2004). Clinical pharmacokinetics of everolimus. *Clinical Pharmacokinetics*, 43(2), 83–95.
- Kleinegger, F., Hofer, E., Wodlej, C., Golob-Schwarzl, N., Birkli-Toeglhofer, A. M., Stallinger, A., Petzold, J., Orlova, A., Krassnig, S., Reihls, R., Niedrist, T., Mangge, H., Park, Y. N., Thalhammer, M., Aigelsreiter, A., Lax, S., Garbers, C., Fickert, P., Rose-John, S., ... Haybaeck, J. (2019). Pharmacologic IL-6Rα inhibition in cholangiocarcinoma promotes cancer cell growth and survival. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1865(2), 308–321.
- Kozhevnikova, E. N., van der Knaap, J. A., Pindyurin, A. V., Ozgur, Z., van Ijcken, W. F. J., Moshkin, Y. M., & Verrijzer, C. P. (2012). Metabolic Enzyme IMPDH Is Also a Transcription Factor Regulated by Cellular State. *Molecular Cell*, 47(1), 133–139.
- Kubala, M. H., & DeClerck, Y. A. (2019). The plasminogen activator inhibitor-1 paradox in cancer: a mechanistic understanding. In *Cancer and Metastasis Reviews* (Vol. 38, Issue 3, pp. 483–492). Springer.
- Lee, Y. S., Choi, I., Ning, Y., Kim, N. Y., Khatchadourian, V., Yang, D., Chung, H. K., Choi, D., LaBonte, M. J., Ladner, R. D., Nagulapalli Venkata, K. C., Rosenberg, D. O., Petasis, N. A., Lenz, H.-J., & Hong, Y.-K. (2012). Interleukin-8 and its receptor CXCR2 in the tumour microenvironment promote colon cancer growth, progression and metastasis. *British Journal of Cancer*, 106(11), 1833–1841.
- Lehnert, L., Lerch, M. M., Hirai, Y., Kruse, M. L., Schmieg, W., & Kalthoff, H. (2001). Autocrine stimulation of human pancreatic duct-like development by soluble isoforms of epimorphin in vitro. *Journal of Cell Biology*, 152(5), 911–921.

- Ling, S., Feng, T., Zhan, Q., Duan, X., Jiang, G., Shen, T., Shan, Q., Xu, S., Ye, Q., Liu, P., Cen, B., Zheng, S., & Xu, X. (2020). Sirolimus-based immunosuppression improves outcomes in liver transplantation recipients with hepatocellular carcinoma beyond the Hangzhou criteria. *Annals of Translational Medicine*, 8(4), 80–80.
- Machairas, N., Stamopoulos, P., Kostakis, I. D., Garoufalia, Z., Paspala, A., Tsaparas, P., & Sotiropoulos, G. C. (2019). Mixed Hepatocellular Cholangiocarcinoma: A Review of Long-Term Outcomes Following Liver Transplantation. *Transplantation Proceedings*, 51(2), 437–439.
- Manzia, T. M., De Liguori Carino, N., Orlando, G., Toti, L., De Luca, L., D'Andria, D., Cardillo, A., Anselmo, A., Casciani, C. U., & Tisone, G. (2005). Use of mycophenolate mofetil in liver transplantation: A literature review. *Transplantation Proceedings*, 37(6), 2616–2617.
- Marcil, I., & Stern, R. S. (2001). Squamous-cell cancer of the skin in patients given PUVA and ciclosporin: nested cohort crossover study. *Lancet (London, England)*, 358(9287), 1042–1045.
- Marsland, A. M., & Griffiths, C. E. M. (2002). The macrolide immunosuppressants in dermatology: mechanisms of action. *European Journal of Dermatology : EJD*, 12(6), 618–622.
- Massironi, S., Pilla, L., Elvevi, A., Longarini, R., Rossi, R. E., Bidoli, P., & Invernizzi, P. (2020). New and Emerging Systemic Therapeutic Options for Advanced Cholangiocarcinoma. *Cells*, 9(3), 688.
- Matsuo, Y., Ochi, N., Sawai, H., Yasuda, A., Takahashi, H., Funahashi, H., Takeyama, H., Tong, Z., & Guha, S. (2009). CXCL8/IL-8 and CXCL12/SDF-1 α co-operatively promote invasiveness and angiogenesis in pancreatic cancer. *International Journal of Cancer*, 124(4), 853–861.
- Mendoza, M. C., Er, E. E., & Blenis, J. (2011). The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: Cross-talk and compensation. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 36, Issue 6, pp. 320–328). NIH Public Access.
- Mihalache, F., Tantau, M., Diaconu, B., & Acalovschi, M. (2010). Survival and quality of life of cholangiocarcinoma patients: a prospective study over a 4 year period. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases : JGLD*, 19(3), 285–290.
- Miwa, S., Miyagawa, S., Kobayashi, A., Akahane, Y., Nakata, T., Mihara, M., Kusama, K., Soeda, J., & Ogawa, S. (2006). Predictive factors for intrahepatic cholangiocarcinoma recurrence in the liver following surgery. *Journal of Gastroenterology*, 41(9), 893–900.
- Morath, C., Schwenger, V., Beimler, J., Mehrabi, A., Schmidt, J., Zeier, M., & Muranyi, W. (2006). Antifibrotic actions of mycophenolic acid. *Clinical Transplantation*, 20(s17), 25–29.
- Nagai, M., Natsumeda, Y., & Weber, G. (1992). Proliferation-linked Regulation of Type II IMP Dehydrogenase Gene in Human Normal Lymphocytes and HL-60 Leukemic Cells. *Cancer Research*, 52(2), 258–261.
- Neri, S., Miyashita, T., Hashimoto, H., Suda, Y., Ishibashi, M., Kii, H., Watanabe, H., Kuwata, T., Tsuboi, M., Goto, K., Menju, T., Sonobe, M., Date, H., Ochiai, A., & Ishii, G. (2017). Fibroblast-led cancer cell invasion is activated by epithelial-mesenchymal transition through platelet-derived growth factor BB secretion of lung adenocarcinoma. *Cancer Letters*, 395, 20–30.
- Nishihira, J. (2000). Macrophage migration inhibitory factor (MIF): Its essential role in the immune system and cell growth. In *Journal of Interferon and Cytokine Research* (Vol. 20, Issue 9, pp. 751–762).
- O'Hayre, M., Salanga, C. L., Handel, T. M., & Allen, S. J. (2008). Chemokines and cancer: Migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment. In *Biochemical Journal* (Vol. 409, Issue 3, pp. 635–649). Portland Press.

- O'Reilly, K. E., Rojo, F., She, Q. B., Solit, D., Mills, G. B., Smith, D., Lane, H., Hofmann, F., Hicklin, D. J., Ludwig, D. L., Baselga, J., & Rosen, N. (2006). mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Research*, 66(3), 1500–1508.
- Okabe, H., Beppu, T., Hayashi, H., Horino, K., Masuda, T., Komori, H., Ishikawa, S., Watanabe, M., Takamori, H., Iyama, K. I., & Baba, H. (2009). Hepatic stellate cells may relate to progression of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Annals of Surgical Oncology*, 16(9), 2555–2564.
- Okabe, H., Beppu, T., Hayashi, H., Ishiko, T., Masuda, T., Otao, R., Horlad, H., Jono, H., Ueda, M., Shinriki, S., Ando, Y., & Baba, H. (2011). Hepatic stellate cells accelerate the malignant behavior of cholangiocarcinoma cells. *Annals of Surgical Oncology*, 18(4), 1175–1184.
- Okada, T., Sawada, T., & Kubota, K. (2009). Rapamycin inhibits growth of cholangiocarcinoma cells. *Hepato-Gastroenterology*, 56(89), 6–10.
- Östman, A., & Augsten, M. (2009). Cancer-associated fibroblasts and tumor growth - bystanders turning into key players. *Current Opinion in Genetics and Development*, 19(1), 67–73.
- Parkin, D. M., Ohshima, H., Srivatanakul, P., & Vatanasapt, V. (1993). Cholangiocarcinoma: Epidemiology, Mechanisms of Carcinogenesis and Prevention. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 2(6), 537–544.
- Peñuelas, S., Noé, V., & Ciudad, C. J. (2005). Modulation of IMPDH2, survivin, topoisomerase I and vimentin increases sensitivity to methotrexate in HT29 human colon cancer cells. *FEBS Journal*, 272(3), 696–710.
- Pópulo, H., Lopes, J. M., & Soares, P. (2012). The mTOR signalling pathway in human cancer. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 13, Issue 2, pp. 1886–1918). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).
- Rizell, M., Andersson, M., Cahlin, C., Hafström, L., Olausson, M., & Lindnér, P. (2008). Effects of the mTOR inhibitor sirolimus in patients with hepatocellular and cholangiocellular cancer. *International Journal of Clinical Oncology*, 13(1), 66–70.
- Sanmamed, M. F., Carranza-Rua, O., Alfaro, C., Oñate, C., Martín-Algarra, S., Perez, G., Landazuri, S. F., Gonzalez, A., Gross, S., Rodriguez, I., Muñoz-Calleja, C., Rodríguez-Ruiz, M., Sangro, B., López-Picazo, J. M., Rizzo, M., Mazzolini, G., Pascual, J. I., Andueza, M. P., Perez-Gracia, J. L., & Melero, I. (2014). Serum interleukin-8 reflects tumor burden and treatment response across malignancies of multiple tissue origins. *Clinical Cancer Research*, 20(22), 5697–5707.
- Sansone, P., & Bromberg, J. (2011). Environment, inflammation, and cancer. *Current Opinion in Genetics and Development*, 21(1), 80–85.
- Sapisochín, G., de Sevilla, E. F., Echeverri, J., & Charco, R. (2015). Liver transplantation for cholangiocarcinoma: Current status and new insights. In *World Journal of Hepatology* (Vol. 7, Issue 22, pp. 2396–2403). Baishideng Publishing Group Co.
- Sapisochin, G., Rodríguez de Lope, C., Gastaca, M., Ortiz de Urbina, J., Suarez, M. A., Santoyo, J., Castroagudín, J. F., Varo, E., López-Andujar, R., Palacios, F., Sanchez Antolín, G., Perez, B., Guiberteau, A., Blanco, G., González-Diéguez, M. L., Rodriguez, M., Varona, M. A., Barrera, M. A., Fundora, Y., ... Bruix, J. (2014). "Very early" intrahepatic cholangiocarcinoma in cirrhotic patients: should liver transplantation be reconsidered in these patients? *American Journal of Transplantation : Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 14(3), 660–667.
- Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Sengupta, S., Sheen, J. H., Hsu, P. P., Bagley, A. F., Markhard, A. L., & Sabatini, D. M. (2006). Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB. *Molecular Cell*, 22(2), 159–168.

- Schmeding, M., & Neumann, U. P. (2013). Liver transplantation for intra- and extrahepatic cholangiocarcinoma. *Annals of Transplantation*, 18(1), 1–8.
- Schust, J., Sperl, B., Hollis, A., Mayer, T. U., & Berg, T. (2006). Stattic: A Small-Molecule Inhibitor of STAT3 Activation and Dimerization. *Chemistry and Biology*, 13(11), 1235–1242.
- Sekiya, S., & Suzuki, A. (2012). Intrahepatic cholangiocarcinoma can arise from Notch-mediated conversion of hepatocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 122(11), 3914–3918.
- Shaib, Y., & El-Serag, H. B. (2004). The epidemiology of cholangiocarcinoma. In *Seminars in Liver Disease* (Vol. 24, Issue 2, pp. 115–125). Copyright © 2004 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA.
- Shin, H.-R., Oh, J.-K., Masuyer, E., Curado, M.-P., Bouvard, V., Fang, Y.-Y., Wiangnon, S., Sripa, B., & Hong, S.-T. (2010). Epidemiology of cholangiocarcinoma: An update focusing on risk factors. *Cancer Science*, 101(3), 579–585.
- Sia, D., Tovar, V., Moeini, A., & Llovet, J. M. (2013). Intrahepatic cholangiocarcinoma: Pathogenesis and rationale for molecular therapies. In *Oncogene* (Vol. 32, Issue 41, pp. 4861–4870).
- Sirica, A. E. (2012). The role of cancer-associated myofibroblasts in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 9(1), 44–54.
- Stewart, T., Henderson, R., Grayson, H., & Opelz, G. (1997). Reduced incidence of rectal cancer, compared to gastric and colonic cancer, in a population of 73,076 men and women chronically immunosuppressed. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 3(1), 51–55.
- Stewart, T., Tsai, S. C., Grayson, H., Henderson, R., & Opelz, G. (1995). Incidence of de-novo breast cancer in women chronically immunosuppressed after organ transplantation. *Lancet (London, England)*, 346(8978), 796–798.
- Takahashi, P., Polson, A., & Reisman, D. (2011). Elevated transcription of the p53 gene in early S-phase leads to a rapid DNA-damage response during S-phase of the cell cycle. *Apoptosis : An International Journal on Programmed Cell Death*, 16(9), 950–958.
- Takebe, N., Cheng, X., Fandy, T. E., Srivastava, R. K., Wu, S., Shankar, S., Bauer, K., Shaughnessy, J., & Tricot, G. (2006). IMP dehydrogenase inhibitor mycophenolate mofetil induces caspase-dependent apoptosis and cell cycle inhibition in multiple myeloma cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(2), 457–466.
- ter Heine, R., van Erp, N. P., Guchelaar, H. J., de Fijter, J. W., Reinders, M. E. J., van Herpen, C. M., Burger, D. M., & Moes, D. J. A. R. (2018). A pharmacological rationale for improved everolimus dosing in oncology and transplant patients. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 84(7), 1575–1586.
- Thongchot, S., Ferraresi, A., Vidoni, C., Loilome, W., Yongvanit, P., Namwat, N., & Isidoro, C. (2018). Resveratrol interrupts the pro-invasive communication between cancer associated fibroblasts and cholangiocarcinoma cells. *Cancer Letters*, 430, 160–171.
- Tian, T., Li, X., & Zhang, J. (2019). mTOR signaling in cancer and mtor inhibitors in solid tumor targeting therapy. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 3). MDPI AG.
- Tjon, A. S. W., Nicolaas, J. S., Kwekkeboom, J., de Man, R. A., Kazemier, G., Tilanus, H. W., Hansen, B. E., van der Laan, L. J. W., Tha-In, T., & Metselaar, H. J. (2010). Increased incidence of early de novo cancer in liver graft recipients treated with cyclosporine: An association with C2 monitoring and recipient age. *Liver Transplantation*, 16(7), 837–846.

- Tremblay, F., Fernandes, M., Habbab, F., de Edwardes, M. D. B., Loertscher, R., & Meterissian, S. (2002). Malignancy after renal transplantation: Incidence and role of type of immunosuppression. *Annals of Surgical Oncology*, 9(8), 785–788.
- Tressler, R. J., Garvin, L. J., & Slate, D. L. (1994). Anti-tumor activity of mycophenolate mofetil against human and mouse tumors in vivo. *International Journal of Cancer*, 57(4), 568–573.
- Végso, G., Sebestyén, A., Paku, S., Barna, G., Hajdu, M., Tóth, M., Járny, J., & Kopper, L. (2007). Antiproliferative and apoptotic effects of mycophenolic acid in human B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Leukemia Research*, 31(7), 1003–1008.
- Verna, E. C., Patel, Y. A., Aggarwal, A., Desai, A. P., Frenette, C., Pillai, A. A., Salgia, R., Seetharam, A., Sharma, P., Sherman, C., Tsoulfas, G., & Yao, F. Y. (2020). Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: Management after the transplant. *American Journal of Transplantation*, 20(2), 333–347.
- Vivarelli, M., Bellusci, R., Cucchetti, A., Cavrini, G., De Ruvo, N., Aden, A. A., La Barba, G., Brilli, S., & Cavallari, A. (2002). Low recurrence rate of hepatocellular carcinoma after liver transplantation: better patient selection or lower immunosuppression? *Transplantation*, 74(12), 1746–1751.
- Wang, Q., Wang, X., Hernandez, A., Hellmich, M. R., Gatalica, Z., & Mark Evers, B. (2002). Regulation of TRAIL expression by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/GSK-3 pathway in human colon cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277(39), 36602–36610.
- Wang, Z., Wang, Z., Li, G., Wu, H., Sun, K., Chen, J., Feng, Y., Chen, C., Cai, S., Xu, J., & He, Y. (2017). CXCL1 from tumor-associated lymphatic endothelial cells drives gastric cancer cell into lymphatic system via activating integrin β 1/FAK/AKT signaling. *Cancer Letters*, 385, 28–38.
- Wels, J., Kaplan, R. N., Rafii, S., & Lyden, D. (2008). Migratory neighbors and distant invaders: tumor-associated niche cells. *Genes & Development*, 22(5), 559–574.
- WILLIAMS, R. H., LIVELY, D. H., DELONG, D. C., CLINE, J. C., SWEENEY, M. J., POORE, G. A., & LARSEN, S. H. (1968). MYCOPHENOLIC ACID : ANTIVIRAL AND ANTITUMOR PROPERTIES. *The Journal of Antibiotics*, 21(7), 463–464.
- Xing, X. L., Lu, Y., & Qiu, H. L. (2016). Effect of cyclosporin on particles of varying diameters on gastric cancer cell apoptosis. *Genetics and Molecular Research*, 15(2).
- Xiong, A., Yang, Z., Shen, Y., Zhou, J., & Shen, Q. (2014). Transcription factor STAT3 as a novel molecular target for cancer prevention. In *Cancers* (Vol. 6, Issue 2, pp. 926–957). MDPI AG.
- Yamaguchi, H., Yoshida, N., Takanashi, M., Ito, Y., Fukami, K., Yanagihara, K., Yashiro, M., & Sakai, R. (2014). Stromal fibroblasts mediate extracellular matrix remodeling and invasion of scirrhous gastric carcinoma cells. *PloS One*, 9(1), e85485.
- Yang, C., Yu, H., Chen, R., Tao, K., Lei, J., Peng, M., Li, X., Liu, M., & Liu, S. (2019). CXCL1 stimulates migration and invasion in ER-negative breast cancer cells via activation of the ERK/MMP2/9 signaling axis. *International Journal of Oncology*, 55(3), 684–696.
- Yothaisong, S., Dokduang, H., Techasen, A., Namwat, N., Yongvanit, P., Bhudhisawasdi, V., Puapairoj, A., Riggins, G. J., & Loilome, W. (2013). Increased activation of PI3K/AKT signaling pathway is associated with cholangiocarcinoma metastasis and PI3K/mTOR inhibition presents a possible therapeutic strategy. *Tumor Biology*, 34(6), 3637–3648.
- Zhou, H. Y., & Huang, S. Le. (2012). Current development of the second generation of mTOR inhibitors as anticancer agents. In *Chinese Journal of Cancer* (Vol. 31, Issue 1, pp. 8–18). BioMed Central.

9 Anhang

Danksagung

Ich danke in erster Linie Herrn Prof. Dr. Holger Kalthoff für seine durchgehende, wissenschaftliche Betreuung der Arbeit, für die Bereitstellung der Forschungsflächen in seinem Institut sowie für die Bereitschaft sich jederzeit mit Fragen an ihn wenden zu können.

Herrn Dr. med. Nils Heits danke ich für die Betreuung der Arbeit sowie für die intensiven und spannenden wissenschaftlichen Diskussionen die immer zur pragmatischen Problemlösung beitrugen. Darüber hinaus danke ich ihm dafür mich in dieser Zeit in jedweder wissenschaftlichen und klinischen Hinsicht gefördert und unterstützt zu haben.

Weiterhin danke ich meinen Laborkollegen Dr. Christian Röder, Betül Temel, Dr. Hendrik Braun, Dr. Ulf Geisen, Hella Schitteck, David Radke und Bianka Zinke für viele nette Stunden im Labor, die Einarbeitung in die Labortätigkeit und die stetige Bereitschaft zur Beantwortung von Fragen. Mein besonderer Dank gilt hierbei Jannik Kerber für die intensive Unterstützung, besonders in der Anfangszeit.

Herrn Dr. med. Alexander Bernsmeier danke ich darüber hinaus für seine stets freundliche und hilfsbereite Art und den stets spannenden und wissenschaftlichen Austausch, auch außerhalb des Labors.

Weiterhin danke ich den Kollegen des anatomischen Instituts, besonders den Professoren Lucius, Wedel und Kurz für die Möglichkeit diese Arbeit, neben meiner dortigen Tätigkeit, zu einem Ende bringen zu können.

Meiner Familie danke ich für jedwede Unterstützung und den Rückhalt den ich während dieser Arbeit und darüber hinaus genießen durfte und dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für Fragen und Probleme hatte. Dies gilt im Besonderen meiner Partnerin Anna, ohne die ich diese Arbeit nicht beendet hätte.

Und zuletzt danke ich meinen Freunden für die vielen Gespräche, ihr Interesse an der Arbeit und vor allem für die gemeinsam verbrachte Zeit.